



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Facultad de Ciencias

Departamento de Química Orgánica

**UTILIZACIÓN DE LIPASAS EN LA PRODUCCIÓN DE
UN NUEVO TIPO DE BIODIESEL QUE EVITA LA
GENERACIÓN DE GLICEROL**

TESIS DOCTORAL

CRISTÓBAL VERDUGO ESCAMILLA

CÓRDOBA, 2011

TÍTULO:*Utilización de lipasas en la producción de un nuevo tipo de biodiesel que evita la generación de glicerol*

AUTOR:*Cristóbal Verdugo Escamilla*

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2012
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es



TÍTULO DE LA TESIS: UTILIZACIÓN DE LIPASAS EN LA PRODUCCIÓN DE UN NUEVO TIPO DE BIODIESEL QUE EVITA LA GENERACIÓN DE GLICEROL

DOCTORANDO/A: CRISTÓBAL VERDUGO ESCAMILLA

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

En esta tesis doctoral se ha llevado a cabo un estudio relativo a la producción de un nuevo tipo de biodiesel que integre la glicerina en forma de mono y diglicéridos, con el objeto de evitar el problema de la obtención de glicerina, lo que constituye un grave problema para la producción industrial de biocombustibles, en países con déficit de agua. De esta forma, se logra además incrementar el rendimiento atómico del proceso, ya que toda la materia prima reaccionante se transformaría en biodiesel.

En los actuales procesos de producción de biodiesel, con independencia de la escala o el tipo de proceso utilizado (continuo o discontinuo), se emplean de forma casi generalizada catalizadores en fase homogénea, como KOH. Son procesos que, además de presentar los inconvenientes intrínsecos de la catálisis homogénea, generan glicerina de baja calidad, que ha de ser tratada como residuo al caer su precio cada vez más por los excedentes que se producen.

Una de las posibles soluciones a este problema y objetivo principal de esta tesis doctoral, es la producción de un nuevo tipo de biodiesel que integre la glicerina en forma de mono y diglicéridos. De esta forma se evitaría el problema de la obtención de glicerina y se incrementaría asimismo el rendimiento atómico del proceso, ya que toda la materia prima reaccionante se transformaría en biodiesel.

La utilización de lipasas 1,3-regioespecíficas en condiciones óptimas, permite llevar a cabo la reacción de transesterificación de un mol de triglicérido (TG) con etanol para obtener dos moles de éster etílico y un mol de monoglicérido (MG), evitándose así la obtención de glicerina. En la actualidad, la glicerina se considera prácticamente como un residuo o un producto muy

poco rentable, que además puede ocasionar graves problemas en los motores si no ha sido eliminada totalmente de la mezcla empleada como biocombustible. La aplicación de éste método enzimático simplificaría enormemente el proceso de producción, ahorrando el gran consumo de agua necesario para eliminar la glicerina, tal como se produce con la utilización del método estándar.

La viabilidad de utilización de este método, así como su simplicidad, queda demostrada en esta memoria, así como en las publicaciones científicas derivadas de ella, y en más de una decena de comunicaciones a congresos, las cuales se detallan a continuación.

PUBLICACIONES CIENTÍFICAS:

1. Artículo de investigación: Production of a second generation biodiesel with a low cost lipase derived from *Thermomyces lanuginosus*: optimization by response surface methodology.
Autores: C. Verdugo et al. *Catalysis Today*. (doi: 10.1016/j.cattod.2010.12.028)
2. Artículo de Investigación: A Comprehensive Study Of Reaction Parameters In The Enzymatic Production Of Novel Biofuels Integrating Glycerol Into Their Composition.
Autores: C. Verdugo et al. *Bioresource Technology*. 101 (2010) 6657-6662.
3. Capítulo de libro: *Jatropha Curcas (L): A Promising Biofuel Plant. Current Status And Future Prospects*.
Autores: Cristóbal Verdugo, Rafael Luque, Diego Luna, Maritza Escalona, Fernando Sagarra, Marcos Daquinta and Jose M. Hidalgo. © 2009 Nova Science Publishers, Inc. (ISBN: 978-1-60876-003-9)
4. Review: Technological challenges for the production of biodiesel in arid lands.
Autores: Diego Luna, Cristóbal Verdugo et al. *Journal of arids environments*. (Submitted)

COMUNICACIONES A CONGRESOS:

1. PREPARATION OF BIODIESEL-LIKE BIOFUELS USING RESPONSE SURFACE METHODOLOGY AND A LOW COST LIPASE DERIVED FROM *THERMOMYCES LANUGINOSUS*. 6th International Conference on Renewable Resources & Biorefineries. Düsseldorf, Germany, 7th – 9th June 2010.
2. NEW BIOFUEL THAT INTEGRATE GLYCERINE AS MONOGLYCERIDE BY USING *RHIZOPUS ORYZAE* DERIVED LIPASE AND RESPONSE SURFACE METHODOLOGY. COST Action CM0903 (UBIOCHEM), 1st Workshop, Córdoba, Spain, 13-15th May 2010.
3. LOW COST LIPASE DERIVED FROM *THERMOMYCES LANUGINOSUS* AND A RESPONSE SURFACE METHODOLOGY FOR PRODUCTION OF A NEW KIND OF BIODIESEL. COST Action CM0903 (UBIOCHEM), 1st Workshop, Córdoba, Spain, 13-15th May 2010.

4. ORGANIC-INORGANIC SOLID HYBRID AS SUPPORT FOR PIG PANCREATIC LIPASE IN BIODIESEL PRODUCTION. II Encuentro sobre Nanociencia y Nanotecnología de investigadores y tecnólogos de la Universidad de Córdoba, 14th January 2010.
5. A NEW BIOFUEL PRODUCTION BY USING RESPONSE SURFACE METHODOLOGY AND *RHIZOPUS ORYZAE* DERIVED LIPASE. II Encuentro sobre Nanociencia y Nanotecnología de investigadores y tecnólogos de la Universidad de Córdoba, 14th January 2010.
6. OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE OBTENCIÓN DE BIODIESEL MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE LA LIPASA PANCREÁTICA DE CERDO 1,3-REGIOSELECTIVA. Spanish Catalysis Society (SECAT'09), Ciudad Real, Spain, 29/June/2009 - 1/July/2009. (ISBN: 978-84-692-3159-3)
7. OPTIMIZING THE PRODUCTION PROCESS ENZYMATIC BIODIESEL THROUGH THE USE OF PORK PANCREATIC LIPASE (PPL). 8th European Congress on Catalysis (EUROPACAT-IX), Salamanca, Spain, 30/August/2009 - 4/September/2009.
8. OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE BIODIESEL MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE LIPASAS DE BAJO COSTE. I Congreso Científico de Investigadores en Formación. Córdoba, Spain, 15-16th October 2009.
9. OPTIMIZING THE PRODUCTION PROCESS ENZYMATIC BIODIESEL THROUGH THE USE OF PORK PANCREATIC LIPASE (PPL). BioMicroWorld 2009, Lisbon, Portugal, 2-4th December 2009.
10. A NEW LIPASE-CATALYZED BIODIESEL BY RESPONSE SURFACE METHODOLOGY USING *RHIZOPUS ORYZAE* DERIVED LIPASE. BioMicroWorld 2009, Lisbon, Portugal, 2-4th December 2009.
11. PRODUCTION OF A NEW BIODIESEL BY USING A LOW COST LIPASE DERIVED FROM *THERMOMYCES LANUGINOSUS* AND RESPONSE SURFACE METHODOLOGY. BioMicroWorld 2009, Lisbon, Portugal, 2-4th December 2009.
12. NEW PROTEINS EXPRESSION BY PGPR *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* UNDER ARSENIC-INDUCED STRESS CONDITIONS. BioMicroWorld 2009, Lisbon, Portugal, 2-4th December 2009.
13. A METHOD FOR DETECTION OF *RHIZOMUCOR MIEHEI* LIPASE ACTIVITY. BioMicroWorld 2009, Lisbon, Portugal, 2-4th December 2009.

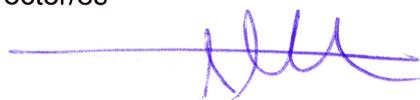
Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 31 de Octubre de 2011

Firma del/de los director/es



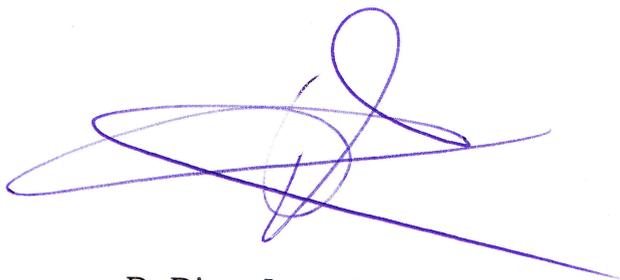
Fdo.:D. Diego Luna Martínez



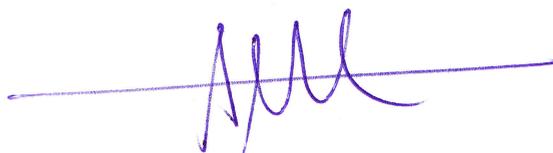
Fdo.: D. Enrique D. Sancho Puebla

**UTILIZACIÓN DE LIPASAS EN LA PRODUCCIÓN DE UN
NUEVO TIPO DE BIODIESEL QUE EVITA LA GENERACIÓN
DE GLICEROL**

Los Directores



D. Diego Luna Martínez
Catedrático del Dpto. de Química Orgánica
Universidad de Córdoba



D. Enrique David Sancho Puebla
Profesor Titular del Dpto. de Microbiología
Universidad de Córdoba

Memoria presentada para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Córdoba.

Fdo: Cristóbal Verdugo Escamilla
Córdoba, a 31 de Octubre de 2011

AGRADECIMIENTOS

Después de todo el tiempo pasado, lleno de buenos y malos momentos, aunque más buenos que malos, me encuentro en el ansiado punto final. Todo este tiempo ha estado lleno de esfuerzos para mí y los míos, pero también lleno de muchas ilusiones que al fin veo cumplidas. Este trabajo me ha regalado mucho, me ha dado amigos y compañeros que jamás olvidaré, me ha dado un punto de vista diferente de la ciencia y sobre todo, creo que me ha hecho crecer personal e intelectualmente.

Todo este esfuerzo no hubiese llegado a buen puerto sin el apoyo y la ayuda de muchísima gente que ha estado a mi alrededor y a los que quiero expresar mi más sincero agradecimiento. Me gustaría empezar, como no, por mis directores de tesis, los profesores Diego Luna Martínez y Enrique Sancho Puebla, ya que sin ellos esto no hubiese sido posible. Les quiero dar las gracias por ser las personas que son, ya que siempre han estado ahí para lo que he necesitado. Por todo ello, quiero expresar mi más sincera gratitud hacia ellos, por ser directores, y sobre todo, por ser amigos, y decirles desde estas líneas, que aquí me tendrán siempre para lo que necesiten.

No quiero dejar de expresar mis agradecimientos a todo el personal de los departamentos de Química Orgánica y de Microbiología de la Universidad de Córdoba por haberme apoyado de alguna u otra forma en este proyecto. Me gustaría dar las gracias de manera especial al profesor D. José María Marinas Rubio, por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación, así como a los profesores D. Juan Manuel Campelo y D. Francisco José Urbano, que como directores del departamento de Química Orgánica, me han permitido realizar todo el trabajo experimental en sus laboratorios. Me gustaría también hacer extensivo el agradecimiento al resto de profesores y personal técnico y administrativo por facilitarme siempre de forma inmediata todo lo que he necesitado.

No quiero por supuesto olvidarme de nombrar a mis compañeros de departamento, a los que les agradezco los momentos vividos, gracias de verdad a todos. En especial, quiero darle las gracias a Lucrecia, M^a Dolores, Eli, Dolores, Yimo y Salva, por los momentos que hemos pasado juntos, risas, discusiones y en general por haber estado ahí.

Muchas gracias también a mis compañeros, jefes y amigos de mi nuevo trabajo en el IACT de Granada, gracias por preguntarme tantas veces “¿Cómo llevas la tesis?”, porque esa pregunta me animaba cada día a terminar, gracias en especial a Duane y a Gavi por ser los más pesados y los que ostentan el record en hacerme esa pregunta.

Por último, pero no por ello menos importante, quiero dar las gracias a los que de verdad me quieren y han sufrido de cerca mis momentos buenos y malos, y de los que constantemente he recibido ánimos. Gracias a mis padres y a mis hermanos, porque sin su esfuerzo esto jamás hubiese sido posible. De verdad, muchas gracias papá y mamá, porque sé que este momento ha sido un reto también para vosotros, y lo hemos conseguido juntos.

Y como no, te he dejado para el final, pero simplemente para poder recrearme. Gracias al amor de mi vida, Yolanda. Gracias cariño, gracias por haber sido mi pilar de apoyo durante todo este tiempo, gracias por haber estado ahí, gracias por haber aguantado esos veranos sin vacaciones en Inglaterra, gracias por aguantarme tantas horas ante el ordenador, gracias por aguantar mis momentos bajos y darme aliento, y simplemente gracias por ser tú y por estar a mi lado, porque solo con eso, me haces la persona más feliz del mundo y has hecho posible que consiga terminar mi tesis doctoral. Gracias Yolanda, gracias por serlo todo para mí.

Gracias a todos, de corazón.

A mis padres,
a mis hermanos,
a Yolanda.

SUMMARY

The high prices of fossil fuels are leading to an intensification of research on biofuel production methods, with the objective of optimizing the production of non-fossil fuels in order to reduce dependence on oil.

In the current biodiesel production processes, regardless of the scale or type of process used (continuous or discontinuous), is frequent the use of catalysts in homogeneous phase, like KOH. This has the disadvantages inherent to the homogeneous catalysis and, in addition, leads to the production of a low quality glycerin, which has to be treated as waste because of its low price. At present, the glycerin is considered almost as a residue, which can also cause serious engine problems if not removed completely from the mixture used as a biofuel.

One of the possible solutions to this problem, and the main objective of this thesis, is the production of a new type of biodiesel that integrate glycerin in its composition in form of mono and diglycerides. This would avoid the problem of generating glycerin and also would increase the yield of the process, since all raw materials would be transformed into biodiesel in the reaction. This thesis focuses on this line, which aims to assess the possibility of using various commercial lipases with 1,3-regiospecificity character, both free and immobilized.

Using 1,3-regiospecificity of lipases in optimal condition, can allow to carry out the transesterification reaction of one mole of triglyceride (TG) with ethanol to give two moles of ethyl ester and one mole of monoglyceride (MG), thus avoiding the production of glycerin. The application of this enzymatic method would greatly simplify the production process, saving the large consumption of water required to remove the glycerin, as occurred with the use of standard methods.

The feasibility of using this method as well as its simplicity, is shown in this thesis, as well as the scientific publications derived from it, and more than a dozen conference communications.

RESUMEN

Los altos precios de los combustibles derivados del petróleo están ocasionando una intensificación de la investigación de los métodos de producción de los biocombustibles, con la idea de optimizar la producción de combustibles de origen no fósil para reducir la dependencia del petróleo.

En los actuales procesos de producción de biodiesel, con independencia de la escala o el tipo de proceso utilizado (continuo o discontinuo), se emplean de forma casi generalizada catalizadores en fase homogénea, como KOH. Son procesos que, además de presentar los inconvenientes intrínsecos de la catálisis homogénea, generan glicerina de baja calidad, que ha de ser tratada como residuo al caer su precio cada vez más por los excedentes que se producen.

Una de las posibles soluciones a este problema y objetivo principal de esta tesis doctoral, es la producción de un nuevo tipo de biodiesel que integre la glicerina en forma de mono y diglicéridos. De esta forma se evitaría el problema de la obtención de glicerina y se incrementaría asimismo el rendimiento atómico del proceso, ya que toda la materia prima reaccionante se transformaría en biodiesel.

La utilización de lipasas 1,3-regioespecíficas en condiciones óptimas, permite llevar a cabo la reacción de transesterificación de un mol de triglicérido (TG) con etanol para obtener dos moles de éster etílico y un mol de monoglicérido (MG), evitándose así la obtención de glicerina. En la actualidad, la glicerina se considera prácticamente como un residuo o un producto muy poco rentable, que además puede ocasionar graves problemas en los motores si no ha sido eliminada totalmente de la mezcla empleada como biocombustible. La aplicación de éste método enzimático simplificaría enormemente el proceso de producción, ahorrando el gran consumo de agua necesario para eliminar la glicerina, tal como se produce con la utilización del método estándar.

La viabilidad de utilización de este método, así como su simplicidad, queda demostrada en esta memoria, así como en las publicaciones científicas derivadas de ella, y en más de una decena de comunicaciones a congresos.

OBJETIVOS

En los actuales procesos de producción de biodiesel, con independencia de la escala o el tipo de proceso utilizado (continuo o discontinuo), se emplean de forma casi generalizada catalizadores en fase homogénea, como KOH. Son procesos que, además de presentar los inconvenientes intrínsecos de la catálisis homogénea, generan glicerina de baja calidad, que ha de ser tratada como residuo al caer su precio cada vez más por los excedentes que se producen.

Una de las posibles soluciones a este problema y objetivo principal de esta tesis doctoral, es **la producción de un nuevo tipo de biodiesel que integre la glicerina en forma de mono y diglicéridos**. De esta forma se evitaría el problema de la obtención de glicerina y se incrementaría asimismo el rendimiento atómico del proceso, ya que toda la materia prima reaccionante se transformaría en biodiesel. La presente tesis se orienta en esta línea, en la que se pretende evaluar la posibilidad de utilización de diversas lipasas comerciales con carácter 1,3-regioespecífico, tanto en forma libre como inmovilizada.

La utilización de lipasas 1,3-regioespecíficas en condiciones óptimas, permite llevar a cabo la reacción de transesterificación de un mol de triglicérido (TG) con etanol para obtener dos moles de éster etílico y un mol de monoglicérido (MG), evitándose así la obtención de glicerina. En la actualidad, la glicerina se considera prácticamente como un residuo o un producto muy poco rentable, que además puede ocasionar graves problemas en los motores si no ha sido eliminada totalmente de la mezcla empleada como biocombustible. La aplicación de éste método enzimático simplificaría enormemente el proceso de producción, ahorrando el gran consumo de agua necesario para eliminar la glicerina, tal como se produce con la utilización del método estándar.

El **objetivo genérico** de esta tesis doctoral, es la **optimización de la producción de un nuevo tipo de biocombustible por vía enzimática, con propiedades fisico-químicas adecuadas, similares a las del biodiesel, que permitan su uso en motores diesel**. Para ello, se plantea el uso de una sistemática de operación simple y en condiciones térmicas lo más suave

posible. Como ejemplo de ello se propone el ajuste de pH con disoluciones de NaOH en vez de buffers más caros y complejos, con la idea de que el proceso sea económico, así como la operación entre 20 - 60 °C como máximo.

Los objetivos parciales de este trabajo son los siguientes:

(a) *Evaluar las posibilidades de utilización de diferentes lipasas disponibles comercialmente en la producción de biodiesel.*

(b) *Determinar las variables más influyentes así como las condiciones de operación más favorables para cada lipasa estudiada (temperatura, pH, tiempo de reacción, peso de la enzima, relación molar aceite/etanol, cantidad de agua permitida en el medio de reacción, tipo de materia prima, etc.).*

(c) *Inmovilizar las lipasas en forma libre seleccionadas, según los métodos de inmovilización descritos en una patente propiedad de la UCO (Patente española 2152121, fecha publicación 16/01/2001), tras excluir aquellas que en forma libre no dieran un resultado adecuado, y posterior evaluación de su comportamiento.*

(d) *Optimizar el proceso de obtención de un nuevo tipo de biocombustible que integre la glicerina en forma de mono o diglicérido en su composición.*

PLAN DE TRABAJO

El plan de trabajo previsto para la realización de la presente tesis doctoral se resume en los siguientes puntos:

1. Selección de distintas lipasas comerciales disponibles

Para ello se procederá a localizar y adquirir aquellas lipasas disponibles comercialmente, para otros usos industriales, y evaluar sus posibilidades para llevar a cabo las reacciones de transesterificación 1,3-selectivas.

2. Evaluación de las diferentes lipasas seleccionadas, operando en forma libre.

Una vez seleccionadas las lipasas comerciales, serán caracterizadas mediante reacciones de transesterificación con aceite de girasol y etanol en distintas condiciones de reacción (peso de enzima, pH, temperatura, relación aceite/etanol, velocidad de agitación, materia prima, contenido de agua del medio de reacción, etc.)

3. Heterogeneización de las lipasas seleccionadas.

Las lipasas que presenten el comportamiento más adecuado, en cuanto a actividad y selectividad, serán inmovilizadas. Para ello se habrá de proceder a la síntesis de los soportes activados y funcionalizados, sobre los que se procederá a efectuar la inmovilización de las lipasas, tanto en forma covalente como por adsorción física.

3.1. Síntesis, funcionalización, activación y caracterización superficial de los soportes utilizados para la inmovilización.

3.2. Heterogeneización de las lipasas seleccionadas y caracterización de los sistemas enzimáticos preparados.

También se evaluará el comportamiento e idoneidad de lipasas inmovilizadas comerciales para la reacción de transesterificación anteriormente citada.

4. Evaluación de la eficiencia de los sistemas enzimáticos heterogeneizados preparados.

Se emplearán los mismos procesos y condiciones empleados para la caracterización del proceso en fase homogénea, es decir se estudiará la transesterificación de aceite de girasol con etanol para la obtención de un nuevo tipo de biocombustible que integre la glicerina en forma de monoglicérido.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 ESTADO ACTUAL DE LOS BIOCOMBUSTIBLES	3
1.2 TECNOLOGÍAS PARA LA PRODUCCIÓN DE BIODIESEL	9
1.3 TECNOLOGÍAS PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES QUE INTEGRAN LA GLICERINA	17
1.4 ENZIMAS	22
1.4.1 CARACTERÍSTICAS COMO BIOCATALIZADORES	22
1.4.2 EVOLUCIÓN HISTÓRICA	25
1.4.3 CLASIFICACION Y NOMENCLATURA	26
1.4.4 CATÁLISIS ENZIMÁTICA EN DISOLVENTES ORGÁNICOS	28
1.4.4.1 ESTRUCTURA ENZIMÁTICA Y ESTABILIDAD EN DISOLVENTES ORGÁNICOS	30
1.4.4.2 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN DISOLVENTES ORGÁNICOS	31
1.4.4.2.1 VALORES DE pH Y SU CONTROL. EFECTO MEMORIA	31
1.4.4.2.2 FORMA ENZIMÁTICA	32
1.4.4.3 SELECTIVIDAD ENZIMÁTICA EN DISOLVENTES ORGÁNICOS. INGENIERÍA DEL MEDIO	35
1.4.5 INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS	36
1.4.5.1 EFECTOS DE LA INMOVILIZACIÓN	48
1.4.5.1.1 EFECTOS EN LA ESTABILIDAD	49
1.4.5.2 APLICACIONES INDUSTRIALES DE LAS ENZIMAS	50
1.4.6 ESTRUCTURA Y MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS LIPASAS	53
1.4.6.1 ACTIVACIÓN INTERFACIAL	54
1.4.6.2 MECANISMO DE REACCIÓN DE LAS LIPASAS	55
1.4.7 EFECTO DEL AGUA EN LA ACTIVIDAD CATALÍTICA	57
2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	61
2.1 MÉTODOS DE ANÁLISIS	61
2.1.1 CARACTERIZACIÓN DE LA MATERIA PRIMA	62
2.1.1.1 DETERMINACIÓN DE HUMEDAD	63
2.1.1.2 DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE ACIDEZ	63
2.1.2 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA LAS REACCIONES	64
2.1.3 CARACTERIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE REACCIÓN	66
2.1.3.1 ENSAYO DE PRESENCIA DE JABONES	66
2.1.3.2 VISCOSIDAD CINEMÁTICA	67
2.1.3.3 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE FAEE Y GLICÉRIDOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE GASES	69
2.2 SÍNTESIS, FUNCIONALIZACIÓN, ACTIVACIÓN Y CARACTERIZACIÓN SUPERFICIAL DE LOS SOPORTES	71
2.2.1 INTRODUCCIÓN	71
2.2.2 SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN SUPERFICIAL DEL SISTEMA ALPO ₄ /SEPIOLITA UTILIZADO COMO SOPORTE	76
2.2.2.1 CARACTERIZACIÓN TEXTURAL MEDIANTE ADSORCIÓN DE N ₂	79
2.2.2.2 CARACTERIZACIÓN ÁCIDO-BASE SUPERFICIAL MEDIANTE ESPECTROFOTOMETRÍA	82
2.2.2.3 ACTIVACIÓN Y FUNCIONALIZACIÓN DEL SOPORTE AIPO ₄ /SEPIOLITA CON 4-AMINOBENCILAMINA Y TEREFTALDIALDEHÍDO	84
2.2.2.4 ACTIVACIÓN Y FUNCIONALIZACIÓN DEL SOPORTE ALPO ₄ /SEPIOLITA SOLO POR REACCIÓN CON p-HIDROXIBENZALDEHÍDO	87
2.2.2.5 SOPORTE SEPIOLITA DESMINERALIZADA	88

2.3 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CATALÍTICA DE LOS SISTEMAS ENZIMÁTICOS	89
2.3.1 SISTEMA FUNCIONALIZADO CON P-HIDROXIBENZALDEHÍDO	91
2.3.2 SISTEMA FUNCIONALIZADO CON 4-AMINO BENCILAMINA Y TEREFTALDIALDEHÍDO	92
2.3.3 SISTEMA SEPIOLITA DESMINERALIZADA	93
2.3.4 LIPASAS INMOVILIZADAS COMERCIALES	94
2.4 DISEÑO EXPERIMENTAL ESTADÍSTICO PARA EVALUAR LAS VARIABLES DE REACCIÓN	95
3. RESULTADOS	99
3.1 LIPASA PANCREÁTICA DE CERDO (PPL)	99
3.1.1 EFECTO DE LAS VARIABLES EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	102
3.1.1.1 INFLUENCIA DE LA RELACIÓN ACEITE/ETANOL EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA PPL	102
3.1.1.2 INFLUENCIA DEL TIEMPO DE REACCIÓN EN LA ACTIVIDAD DE LA PPL	104
3.1.1.3 INFLUENCIA DE LA CANTIDAD DE PPL EN EL MEDIO DE REACCION	105
3.1.1.4 INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN LA ACTIVIDAD DE LA PPL	107
3.1.1.5 EFECTO DEL CONTENIDO DE AGUA DEL MEDIO DE REACCIÓN	108
3.1.1.6 EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE HIDRÓXIDO DE SODIO UTILIZADA PARA AJUSTAR EL pH DEL MEDIO DE REACCIÓN	109
3.2 LIPOPAN 50 BG	111
3.2.1 EFECTO DE LAS VARIABLES EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	111
3.2.1.1 EFECTO DEL AGUA AÑADIDA	112
3.2.1.2 EFECTO DE LA CANTIDAD DE LIPASA	113
3.2.1.3 DISEÑO EXPERIMENTAL PARA L50BG	114
3.2.1.4 ANÁLISIS DE LOS DATOS	119
3.2.1.4.1 RESULTADOS PARA CONVERSIÓN	119
3.2.1.4.2 RESULTADOS PARA CONTENIDO EN FAEE	124
3.2.1.4.3 RESULTADOS PARA VISCOSIDAD CINEMÁTICA	130
3.2.2 EXPERIMENTOS DE VALIDACIÓN DE LOS MODELOS	136
3.2.3 INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA	137
3.3 BIOLIPASA R	139
3.3.1 EFECTO DE LAS VARIABLES EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	139
3.3.1.1 EFECTO DEL AGUA AÑADIDA	140
3.3.1.2 EFECTO DE LA CANTIDAD DE LIPASA	141
3.3.1.3 DISEÑO EXPERIMENTAL PARA LA BIOLIPASA R	142
3.3.1.4 ANÁLISIS DE LOS DATOS	147
3.3.1.4.1 RESULTADOS PARA LA CONVERSIÓN	147
3.3.1.4.2 RESULTADOS PARA CONTENIDO EN FAEE	154
3.3.1.4.3 RESULTADOS PARA LA VISCOSIDAD CINEMÁTICA	159
3.3.2 EXPERIMENTOS DE VALIDACIÓN DE LOS MODELOS	160
3.3.3 INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA	161
4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS: LIPASAS EN FORMA LIBRE	165
4.1 LIPASA PANCREÁTICA DE CERDO (PPL)	165
4.2 BIOLIPASA R (LR)	173
4.3 LIPOPAN 50 BG (LLBG)	187

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN: LIPASAS INMOVILIZADAS	203
5.1 INMOVILIZACION DE LA BIOLIPASA R	205
5.1.1 CARACTERIZACIÓN SUPERFICIAL DE LOS MATERIALES UTILIZADOS COMO SOPORTE	205
5.1.2 FUNCIONALIZACIÓN Y ACTIVACIÓN DEL SISTEMA ALPO ₄ /SEPIOLITA UTILIZADO COMO SOPORTE	206
5.1.2.1 FUNCIONALIZACIÓN Y ACTIVACIÓN DEL SOPORTE ALPO ₄ /SEPIOLITA POR REACCIÓN CON 4-AMINOBENCILAMINA Y TEREFTALDIALDEHÍDO	208
5.1.2.2 FUNCIONALIZACIÓN Y ACTIVACIÓN DEL SOPORTE AIPO ₄ /SEPIOLITA CON p-HIDROXIBENZALDEHÍDO	210
5.1.3 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CATALITICA DE LOS SISTEMAS SEPIOLITA/ALPO ₄	212
5.1.4 SISTEMA QUE USA SEPIOLITA COMO MÉTODO DE RETENCIÓN FÍSICA	215
5.1.5 REUTILIZACIÓN DE LOS SISTEMAS INMOVILIZADOS	218
5.1.6 REACCIÓN CON RESIDUOS GRASOS DE ORIGEN ANIMAL	220
5.2 LIPOZYME RM IM	222
5.2.1 INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA DE REACCIÓN	222
5.2.2 INFLUENCIA DEL CONTENIDO DE LIPASA	223
5.2.3 INFLUENCIA DEL CONTENIDO EN AGUA	225
5.2.4 REUTILIZACIÓN DE LA ENZIMA INMOVILIZADA	226
6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	231
7. CONCLUSIONS	241
8. REFERENCES	245
9. APPENDIX	267

1.

INTRODUCCIÓN

1.1

ESTADO ACTUAL DE LOS BIOCOMBUSTIBLES

Los altos precios de los combustibles derivados del petróleo y el agotamiento de las reservas petrolíferas han propiciado un incremento de la demanda de combustibles alternativos. Algunos países, incluido España, ya han comenzado a desarrollar tecnologías y cultivos energéticos para la introducción gradual de estos combustibles, así como el caso de Brasil, que produce bioetanol a partir de caña de azúcar, y Estado Unidos, a partir de maíz. En la **Tabla 1.1** se observa la evolución del consumo de biodiesel en Europa, así como una previsión de su consumo basada en las directrices europeas aprobadas para el fomento de uso de biocarburantes.

Además de lo dicho, podemos indicar que el análisis básico del escenario energético mundial, realizado a partir de datos sobre producción, consumo y reservas de crudo a nivel mundial, fácilmente disponibles a partir de los datos que proporciona la Agencia Internacional de la Energía (AIE), pronostican, tal como se está produciendo en la actualidad, un rápido repunte en los precios del barril de petróleo, que esta conduciendo de forma inmediata a elevar el precio del combustible diesel y a trastocar las estimaciones realizadas, en el sentido de que comience a ser rentable el aprovisionamiento de grasas y/o aceites de uso alimentario, con fines energéticos.

Considerando las reservas actuales de crudo conocidas, y su consumo anual, es fácil comprobar que éstas se agotarán inexorablemente en los próximos 40 años. Así, manteniendo un consumo anual de 31.000 millones de barriles (valor medio de dos años consecutivos de bajo consumo), de no mediar el hallazgo imprevisto de nuevos y abundantes depósitos de crudo, en solo dos décadas las reservas se habrán reducido a la mitad, momento en que

los gastos de explotación de un yacimiento comienzan a incrementarse de forma apreciable.

Por tanto, es fácil visualizar un futuro escenario económico donde el petróleo alcance unos precios ahora inimaginables, pues a la escasez de las reservas conocidas, habrá que sumar otros factores adversos, como son, la dificultad creciente de hallar nuevos yacimientos, su inaccesibilidad y la deficiente calidad del crudo, lo que incrementaría los costes de explotación del yacimiento y de producción de sus derivados. A esto habría que unir factores como la inestabilidad política de las zonas donde se encuentran los principales yacimientos, como viene sucediendo en los últimos tiempos, y el previsible aumento en la demanda de países emergentes, como China, segundo consumidor mundial de crudo en la actualidad, tras Estados Unidos, India y otros países de gran población en el extremo Oriente. Debido a estos y otros factores, algunos países, incluido España, ya han comenzado a desarrollar políticas energéticas que apuestan por la utilización de biocombustibles y cultivos energéticos para la introducción gradual de biocombustibles en el mercado así como.

La producción de biodiesel prevista (**Tabla 1.1**), en caso de aplicar una tecnología convencional, conducirá a la producción total de glicerina mostrada en la **Tabla 1.2**. El mercado de la producción industrial de glicerina, dirigido durante años, en principio, hacia la industria farmacéutica, se encuentra prácticamente saturado en la actualidad, por las grandes cantidades obtenidas, precisamente como subproducto en la fabricación de biodiesel [1].

En la **Tabla 1.3** se registra la caída del precio de este producto, lo que está haciendo cada vez menos rentable la producción de glicerina a partir del subproducto obtenido en la fabricación de biodiesel. Por ello, es muy posible que en poco tiempo la glicerina tenga que gestionarse como un residuo en vez de como un subproducto.

Tabla 1.1. Evolución del consumo de biodiesel en Europa y estimación basada en las directrices europeas para el fomento de biocarburantes (Datos de la Agencia Andaluza de la Energía).

Datos de consumo / producción	2001	2002	2003	2004	2005	2010	2020*
Millones de toneladas / año diesel consumidas en Europa	145				172	199	226
% Biofuel propuesto como consumo según directivas UE					2	5,75	10
Consumo real o estimado en % de biofuel en Europa			0,5		1	4	
Millones de toneladas / año de biodiesel de capacidad productiva en Europa	0,8	1	1,5	2	3,4	7,9	22,6

* Datos estimados

Tabla 1.2. Evolución del consumo de biodiesel y generación de glicerina en Europa. Estimación basada en las directrices europeas para el fomento de biocarburantes (Datos de la Agencia Andaluza de la Energía).

Millones Tm / año	2001	2002	2003	2004	2005	2010	2020*
Millones de toneladas / año de biodiesel producido en Europa	0,8	1	1,5	2	3,4	7,9	22,6
Millones de toneladas / año de glicerina producida en Europa	0,08	0,1	0,15	0,2	0,34	0,79	2,26

* Datos estimados

Tabla 1.3. Evolución del precio de la glicerina desde el año 2000 a 2010. [1]

Glicerina	Año 2000	Año 2005	Año 2010
Refinada	1,50 €	0,90 €	0,60 €
Cruda	1,10 €	0,60 €	0,30 €

En consecuencia, la producción de biocombustibles que integren de alguna manera la glicerina, se ha convertido, en la actualidad, en un objetivo de máximo interés. En los biocarburantes así obtenidos, no solo se evita la generación de glicerina, con el consiguiente gasto hídrico que ello conlleva para su eliminación del biodiesel donde queda como contaminante (contenido máximo en glicerol 0,02 % EN14214), sino que se obtiene un incremento del rendimiento en la producción de biodiesel del orden del 10 %, que antes se perdía en forma de glicerina. Además, este tipo de biocombustible puede usarse directamente sin ningún tipo de tratamiento posterior, lo que reduciría de forma importante los costos del proceso y evitaría la generación de aguas residuales.

Para lograr el objetivo de la integración de la glicerina en el biocombustible existen hoy día varias posibilidades en estudio, que serán tratadas con más detalle más adelante, dado que constituyen la única forma de evitar la tediosa operación de limpieza de la glicerina generada en el proceso. La norma EN14214 limita los valores de la glicerina ($< 0,02\%$), ya que al reaccionar con el oxígeno en el interior del motor a elevada temperatura, experimenta un proceso de oxidación hasta acroleína y una posterior polimerización (**Figura 1.1**) que da lugar a la aparición de depósitos carbonosos en los inyectores, pistones y válvulas (**Figura 1.2**), lo que reduce la eficiencia de los motores y puede ocasionar serias averías [2].

Por tanto, la investigación en biocombustibles es una necesidad de primera magnitud ya que, como se ha indicado se estima que dentro de 40 - 50 años las actuales reservas petrolíferas conocidas se habrán agotado, y los yacimientos que permanezcan serán de difícil acceso (a gran profundidad en los océanos). Así pues, se prevé que podría ocurrir un desabastecimiento mundial, provocando el alza continuada del precio de los combustibles, lo que repercutirá de forma continuada en la economía mundial en las próximas décadas. Por ello, es importante que se desarrollen investigaciones de tecnologías de primera y segunda generación para la producción de biocombustibles; de hecho, el mercado mundial de los mismos está creciendo continuamente debido sobre todo a las fuertes subvenciones que recibe, en base a su inocuidad medioambiental, ya que no computa a efectos del CO_2

que generan en su combustión (Tratado de Kyoto), disminuyendo la emisiones de SO_x (óxidos de azufre) y reduciéndose notablemente el nivel de partículas en comparación con los combustibles de origen fósil, cuando se encuentran mezclados con ellos (**Figura 1.3**).

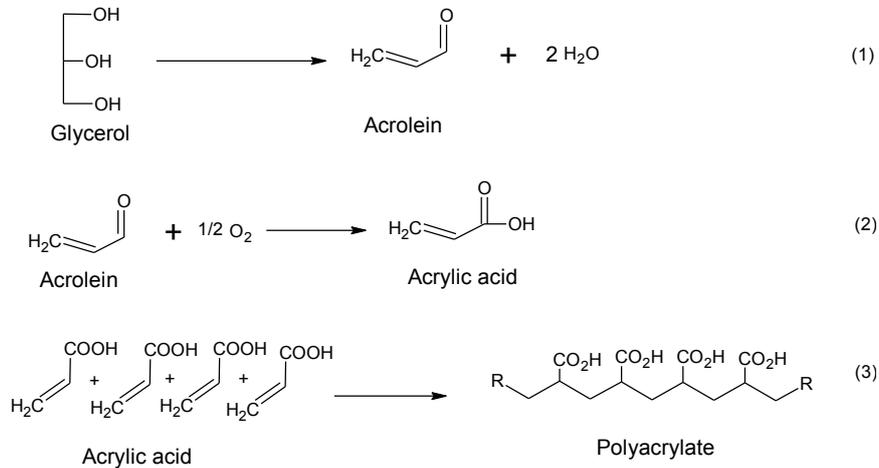


Figura 1.1. Reacciones de deshidratación, oxidación y polimerización que experimenta la glicerina residual presente en el biodiesel dentro de un motor diesel [Deshidratación (1), Oxidación (2) y Polimerización (3)].



Figura 1.2. Deposición de restos carbonosos en diversas partes de un motor diesel ocasionados por el uso de biodiesel con un alto contenido en glicerina.

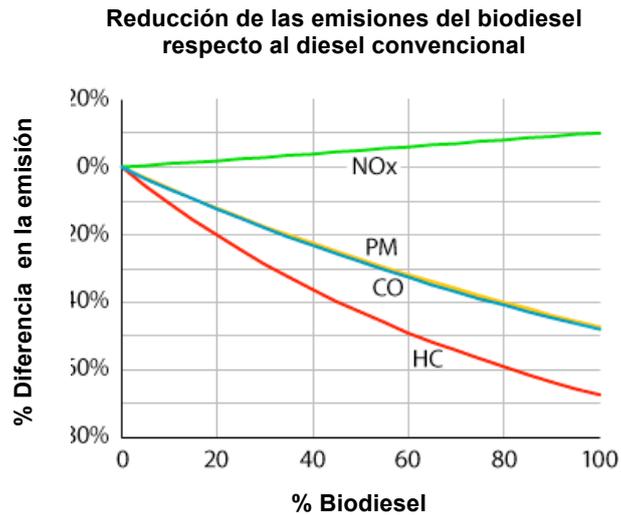


Figura 1.3. Emisiones del biodiesel respecto al diesel convencional (Fuente: U.S. Environmental Protection Agency, EPA. A Comprehensive Analysis of Biodiesel Impacts on Exhaust Emissions).

En definitiva, aunque actualmente los biocombustibles no sean aún capaces de reemplazar totalmente la demanda mundial de combustibles, pueden ir cubriendo una parte creciente de la demanda, lo que reducirá en gran medida la dependencia de las fuentes fósiles, alargando la vida de las actuales reservas petrolíferas, suavizando así la transición a un previsible escenario mundial sin combustibles fósiles.

1.2

TECNOLOGÍAS PARA LA PRODUCCIÓN DE BIODIESEL

Los biocombustibles se consideran de primera o segunda generación en función de la materia prima empleada. Así, si se emplean productos agrícolas comestibles (maíz o caña de azúcar) para producir bioetanol, o aceites comestibles (soja, girasol, colza, o grasas animales comestibles) para producir biodiesel, se trata de biocombustibles de *primera generación*. La sensibilización social respecto al problema que puede originarse en un futuro, al detraer alimentos para su uso energético, ha propiciado la investigación en tecnologías que posibiliten la utilización de residuos agrícolas o industriales para su transformación en biocombustibles, pasando estas tecnologías a denominarse de *segunda generación*.

En lo que respecta al biodiesel, se considera de segunda generación el producido a partir de aceites obtenidos mediante cultivos de plantas no comestibles (o de algas, de gran actualidad), aceites usados o de mala calidad, aceites no aptos para consumo humano o desechos ricos en grasas de algunas industrias como mataderos, además de restos de cualquier tipo de triglicéridos no comestibles, por humanos o animales.

La producción de biodiesel de primera generación es la primera etapa para la incorporación de biocombustibles en un país, ya que es una tecnología al alcance de todos, conocida y utilizada desde la Segunda Guerra Mundial para el aprovisionamiento de glicerina, masivamente empleada en la producción de explosivos, hasta el desarrollo de procesos de obtención de la glicerina a partir de productos petrolíferos como el propano.

Es evidente que debe tenerse un especial cuidado para seleccionar la tierra y los cultivos destinados a la producción de materia prima, no reemplazar zonas destinadas para el cultivo de productos de consumo humano, o utilizar cultivos no aptos para el consumo humano. Conviene investigar aquellos procesos que, aún partiendo de cualquiera de las

anteriores materias primas, no generen ni glicerina, ni ningún tipo de residuos o subproductos. Es decir, se trata de aplicar los conceptos de la Química Verde para la producción de biocombustibles, ya que el proceso actual presenta un rendimiento de solo aproximadamente el 90 %, al generar glicerina como subproducto. La obtención de un nuevo biodiesel con un rendimiento atómico del proceso del 100 % es por tanto una prioridad en la I+D+i actual. Las ventajas de estas últimas tecnologías supondrían un mayor aprovechamiento de los recursos y una menor generación de residuos. Sin embargo, por diferentes motivos, estos nuevos biocombustibles aún no han sido puestos en práctica a escala industrial. Una de las causas principales es de tipo legal, ya que hasta fechas muy recientes (octubre 2008) [3], no han sido autorizados para su comercialización en la red de gasolineras de España. En este sentido, para su adaptación a la normativa legal establecida para el biodiesel, tanto en España como en la Unión Europea, se ha incorporado el término biodiesel en un concepto legal más amplio, como es el de “biocombustible en diesel” o “biocombustible en gasolina”, donde este último englobaría el concepto de bioetanol.

El biodiesel convencional es por tanto ahora uno más de los biocombustibles de origen renovable, capaz de operar en motores diesel, constituido por una mezcla de FAME o FAEE (*Fatty Acid Methyl Ester* o *Ethyl Ester*) obtenido mediante una reacción de transesterificación de aceites vegetales u otras materias primas, como pueden ser grasa animal o aceite usado, con alcoholes simples como metanol o etanol para dar los correspondientes monoalquil ésteres [2, 4]. Este biodiesel presenta grandes ventajas en comparación con el diesel de origen fósil, como son, menores emisiones de gases contaminantes (excepto NO_x), biodegradabilidad, ausencia de azufre, mayor poder lubricante del motor, un balance energético positivo, elevado punto de inflamación (*flash point*), compatibilidad con las infraestructuras logísticas existentes, es renovable y se puede fabricar incluso con residuos de materias primas de origen doméstico. Solo presenta un serio inconveniente, la producción de glicerina como subproducto de la reacción de transesterificación y todo lo que ello conlleva, como la necesidad de lavar el biodiesel, la purificación de la glicerina, etc.

En efecto, la reacción de transesterificación de un mol de triglicérido (TG) con tres moles de alcohol forma un mol de glicerina (GLY) y tres moles de ésteres del ácido graso, constituyendo en realidad una secuencia de tres reacciones reversibles, en las cuales la molécula de triglicérido se convierte paso a paso en diglicérido (DG), monoglicérido (MG) y glicerina. En cada etapa se consume un mol de alcohol y se libera un mol de éster. El esquema de reacción de la **Figura 1.4**, representa la transesterificación con etanol (etanólisis). Normalmente, para poder desplazar el equilibrio, el alcohol se emplea en exceso, respecto a la cantidad estequiométrica, en el proceso de producción de biodiesel por el método convencional. Tras la reacción, se obtienen dos fases no miscibles (**Figura 1.5**), una fase superior donde se encuentran los ésteres etílicos (o metílicos), es decir el biodiesel, y una fase inferior donde está la glicerina disuelta en el exceso del alcohol empleado.

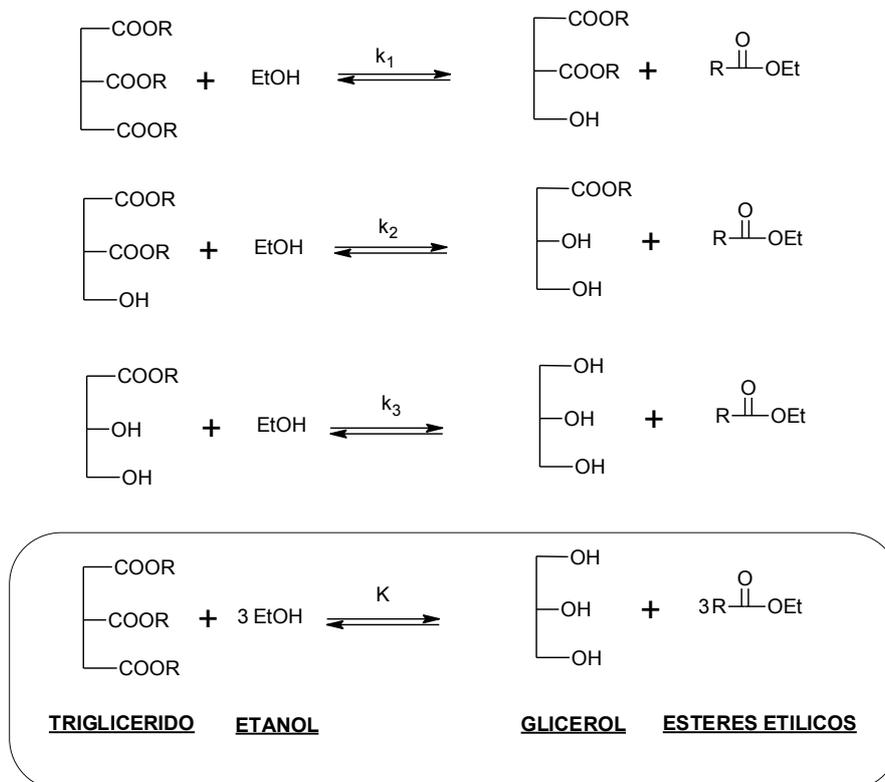


Figura 1.4. Esquema de la reacción de transesterificación de triglicéridos con etanol (etanólisis) mediante catálisis básica.



Figura 1.5. Separación por decantación del biodiesel y la glicerina disuelta en el exceso de alcohol.

Tras separar por decantación el biodiesel (**Figura 1.5**), se puede aislar la glicerina de la mezcla de reacción y recuperar por destilación el alcohol en exceso, para ser reutilizado. Sin embargo, esta aparente fácil solución oculta dos grandes inconvenientes, consecuencia de la solubilidad parcial del biodiesel en la solución alcohólica que contiene la glicerina, y también de la glicerina en la mezcla de biodiesel. Esto obliga a la realización de una operación de lavado del biodiesel con agua para limpiarlo de glicerina (impureza que provoca daños en el motor, como ya se ha indicado) y a la obtención de una glicerina fuertemente contaminada por los FAEE o FAME's, disueltos en el alcohol. En efecto, la limpieza de la glicerina obtenida es un proceso complejo que encarece de forma importante la obtención de una glicerina con una pureza adecuada (90 %) para su comercialización. De hecho este producto ya se está gestionando como un residuo orgánico, empleado para compostaje (con o sin aprovechamiento del metano) o incineración en cementeras [4].

Todos estos problemas se resuelven a escala industrial, integrando los dispositivos adecuados, tanto para la consecución de la reacción con altos niveles de conversión, limpieza del biodiesel obtenido y para la recuperación de glicerina y del exceso de metanol empleado. La tecnología más ampliamente

utilizada en la industria de producción de biodiesel es el proceso Lurgi, [5,6], que ha sido desarrollado por la empresa alemana del mismo nombre y que ofrece plantas de biodiesel con capacidades de producción desde 100 hasta 1000 toneladas/día. El proceso consiste en un intenso mezclado del catalizador (metóxido sódico o potásico) con el aceite con posterior separación por gravedad de las dos fases generadas, FAME y glicerina. En la **Figura 1.6** se puede observar el esquema del proceso.

El aceite, metanol y metóxido sódico son mezclados en el Reactor 1 seguido de una etapa de separación de las dos fases. La fase superior (FAME) es mezclada de nuevo con más metanol y catalizador en el Reactor 2 y seguidamente se lleva a cabo otra etapa de separación por gravedad. Este segundo reactor maximiza el rendimiento del proceso y la calidad del producto. La fase superior (FAME) es lavada para eliminar la glicerina, metanol y catalizador residuales, seguido de un secado a vacío.

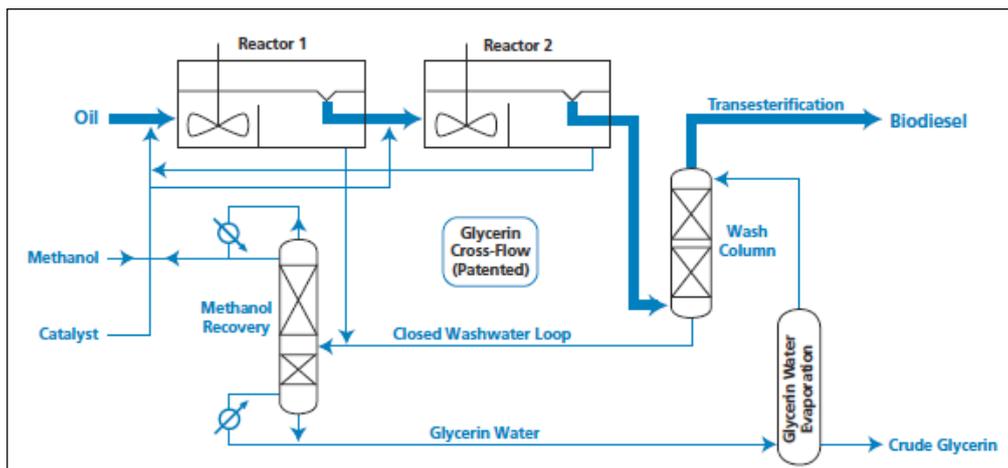


Figura 1.6. Esquema del proceso Lurgi para la producción de biodiesel [5,6].

Sin embargo, este proceso tiene ciertos inconvenientes asociados con su carácter homogéneo, como son la pérdida del catalizador, que puede usarse una sola vez, y la necesidad de eliminar la gran cantidad de sales generadas

en el proceso de neutralización del catalizador fuertemente básico. Esto conlleva varias etapas de limpieza, incluyendo la neutralización y lavado del biodiesel, con el consiguiente consumo de grandes cantidades de agua que posteriormente deberá tratarse para eliminar el gran contenido en sales que posee. Todo ello, inevitablemente aumenta el costo del proceso y merma además la calidad de la glicerina obtenida como subproducto al estar contaminada con sales difíciles de eliminar debido a su alta solubilidad en aquélla.

Con el objeto de mejorar el proceso, se están investigando en la actualidad una gran cantidad de procesos basados en la catálisis heterogénea, donde se usan catalizadores sólidos insolubles en el medio de reacción, como por ejemplo metales alcalinos en forma de óxidos y/o carbonatos en numerosas mezclas entre ellos, pero siempre participando en las mezclas metales alcalinos [7]. Además de estos catalizadores, están ganando gran interés las lipasas como un catalizador alternativo que puede evitar los inconvenientes del proceso actual generando un biocombustible limpio y de una gran pureza.

La reacción de transesterificación de aceites y grasas a escala industrial, aplicada o no a la obtención de biodiesel, es siempre un proceso catalizado, que puede efectuarse tanto en medio ácido o básico, así como por la acción de enzimas específicas como son las lipasas. Hasta el momento, operar en medio básico presenta importantes ventajas respecto a la aplicación de la catálisis ácida, ya que la cinética de la reacción es mucho más favorable, lo que permite operar con menores cantidades de alcohol y a presión atmosférica. Además, en medio homogéneo los álcalis son menos corrosivos que las disoluciones ácidas. Como ya se ha comentado, los procesos industriales en curso emplean como catalizador, en fase homogénea, mezclas de metanol con diferentes hidróxidos alcalinos para obtener los correspondientes metóxidos, fundamentalmente NaOH o KOH, ya que son los que proporcionan mejores rendimientos, y en condiciones relativamente menos energéticas (70 °C y alcohol/aceite 2 - 4/1).

Recientemente se ha publicado el uso de catalizadores heterogéneos de carácter ácido para la esterificación de los FFA (*Free Fatty Acid*) y transesterificación de triglicéridos de forma simultánea obteniéndose elevadas conversiones [8]. En general, el operar en fase heterogénea mejora la calidad del biodiesel y la glicerina, y reduce así mismo las operaciones de lavado. Sin embargo, no es aconsejable su aplicación industrial debido al encarecimiento del proceso ocasionado por una disminución notable de la actividad catalítica, que obliga a trabajar a temperaturas y presiones más elevadas, y con elevadas proporciones de alcohol/aceite.

Por otra parte, las lipasas de diversos microorganismos han sido y están siendo ampliamente investigadas en este proceso, ya que constituyen las enzimas específicas que ejecutan en los seres vivos las reacciones de hidrólisis o síntesis de los enlaces éster de los triglicéridos. Por tanto, la comparación de los resultados obtenidos por cualquiera de las lipasas, con los métodos convencionales basados en la catálisis ácido-básica, sólo comporta ventajas. Así, las condiciones de operación son mucho más suaves (20 - 60 °C y 1 atm) y no es necesaria la eliminación de ningún tipo de impurezas (ácidas o alcalinas), por lo que la separación de fases se simplifica, obteniéndose biodiesel y glicerina de gran pureza, adecuada para usos farmacéuticos, reduciendo por tanto el impacto medioambiental del proceso [9].

El elevado precio que presentan las enzimas en general, y por tanto las lipasas, limita de forma determinante su aplicación a escala industrial. Para paliar esta situación existe un consenso generalizado, que implica la utilización de lipasas de bajo coste y/o su fijación o inmovilización (heterogeneización) en cualquier tipo de soporte, compatible con el proceso al que se desee aplicar. Tras la inmovilización se han descrito incrementos en la actividad y estabilidad de las enzimas respecto a su comportamiento en forma homogénea [10].

Por tanto, las desventajas asociadas al procedimiento actual de producción de biodiesel mediante catálisis homogénea en medio básico (el elevado consumo de agua de lavado empleada para eliminar los restos alcalinos y la glicerina del biodiesel, el tratamiento alcalino o ácido previo

necesario para eliminar los ácidos libres antes de iniciar la transesterificación, la obtención de glicerina de baja calidad, etc.), podrían solventarse mediante la utilización de lipasas inmovilizadas y/o de relativamente bajo costo, lo que permitiría su reutilización y facilitaría también el procedimiento experimental para el aislamiento y purificación de los productos de la reacción.

En lo que respecta a la utilización de lipasas para la producción de biodiesel, se han descrito numerosos procesos efectuados siempre a escala de laboratorio, donde se ensayan lipasas de muy diversos orígenes, empleando aceites de diversa procedencia, vegetal y animal (soja, girasol, palma, coco, semillas, sebo, aves, pescados, etc.) incluyendo aceites ya usados, y diversos alcoholes de cadena corta (metanol, etanol, 1 y 2 propanol, 1 y 2-butanol) y otros, como el 2-etil-1-hexanol. En la mayoría de los casos se obtienen conversiones > 90%, operando a temperaturas en el intervalo 35 - 50 °C, tiempos de reacción de 12 á 70 horas y relaciones alcohol/aceite 3/1 o superiores [11-19]. Hasta el momento, a pesar de la gran cantidad de estrategias descritas en la bibliografía, el elevado precio de las lipasas y/o la ineficiencia de los métodos de inmovilización han hecho comercialmente inviable los intentos de aplicar a escala industrial el procedimiento enzimático (tanto en forma libre como fijadas por diversos métodos). De ahí, la necesidad de conseguir mejoras importantes, tanto en los métodos de inmovilización de enzimas, como en la reducción de los periodos tan largos de reacción necesarios para conseguir altos rendimientos (90 - 100 %).

Sin embargo, la aplicación de las lipasas está manifestando un gran interés en la producción de biocombustibles que integran la glicerina como un derivado soluble en los FAME o FAEE, que siguen constituyendo la mayor parte del biocombustible. Estas mezclas mantienen por tanto unas propiedades físico-químicas muy similares al biodiesel convencional (100 % FAME o FAEE), por lo que pueden sustituirlo sin mayores inconvenientes como biocombustible, consiguiendo así una eficiencia atómica del proceso del 100% con respecto a la materia prima empleada.

1.3

TECNOLOGÍAS PARA LA PRODUCCIÓN DE
BIOCOMBUSTIBLES QUE INTEGRAN LA GLICERINA

Los biocarburantes que integran la glicerina no sólo evitan la generación de residuos, sino que se obtiene un incremento ($\approx 10\%$) en el rendimiento del proceso al integrar la glicerina en el producto de la reacción, así como una reducción importante de los costes del proceso al evitarse los tratamientos posteriores de lavado y limpieza del biodiesel y la consiguiente gestión de las aguas residuales generadas.

La limpieza de la glicerina de los biocombustibles es inevitable cuando ésta se genera en el proceso, ya que su presencia en el combustible desemboca en una oxidación hasta acroleína y posterior polimerización que genera depósitos carbonosos en los inyectores, pistones y válvulas, reduciendo la eficiencia y vida útil de los motores (**Figuras 1.1 y 1.2**) [20].

En investigaciones recientes se ha demostrado también que los componentes minoritarios del biodiesel estándar (que por lo general se consideran contaminantes según la norma EN 14214), entre ellos los FFA y los MG, son esencialmente responsables de la elevada lubricidad que se obtiene en las mezclas de biodiesel y petrodiesel, aún a niveles muy bajos de estos componentes. Se ha de mencionar que los FAME muy puros presentan una elevada reducción de la lubricidad, en comparación con el biodiesel que contiene estos compuestos [21]. Cabe esperar que la presencia de mayores cantidades de MG y/o FFA así como de diversos derivados de éstos, en un nuevo tipo de biocombustible que incorpora la glicerina, aumente la lubricidad del biocarburante, que es una importante característica diferencial de los biocombustibles, mejorando el funcionamiento y la vida útil de los motores.

Hasta el momento se han obtenido interesantes resultados, recogidos en una patente [22,23], empleando la capacidad de las lipasas y en particular de la lipasa pancreática de cerdo (*PPL*, *Pig Pancreatic Lipase*), tanto en forma libre

como inmovilizada, en la transesterificación 1,3-selectiva de los TG a los correspondientes 2-monoacilderivados de la glicerina ó MG y la generación de dos moles de FAEE, empleando etanol. En esta patente se propone esta mezcla como un nuevo “biocombustible en diesel” al que se denomina ECODIESEL®. Es interesante destacar que los procesos de transesterificación enzimáticos pueden llevarse a cabo con diferentes alcoholes de cadena corta (etanol, 1- y 2-propanol, 1- y 2-butanol, etc.) y sus mezclas, no estando en principio limitados al empleo de metanol, como sucede en los procesos químicos convencionales basados en catálisis ácida o básica. El proceso se resume en la **Figura 1.7**.

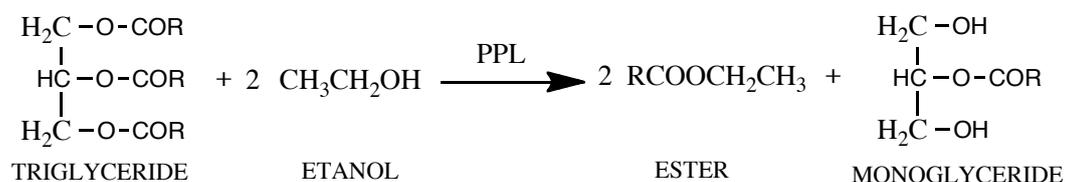


Figura 1.7. Esquema de reacción del Ecodiesel®, biocombustible obtenido por tecnología enzimática y patentado por la Universidad de Córdoba (UCO) que incorpora la glicerina en forma de monoglicérido.

Así mismo, se están abordando actualmente otras alternativas para preparar ésteres de ácidos grasos a partir de lípidos, que generen en el proceso directamente diversos coproductos derivados de la glicerina. La reacción de transesterificación de los triglicéridos con carbonato de dimetilo (DMC) [24] produce una mezcla de tres moles de FAME ó FAEE y uno de carbonato de glicerol (GC). Esta mezcla (FAME + GC), presenta unas propiedades físicas adecuadas para ser empleados como combustible, siendo presentado como un nuevo biocombustible denominado DMC-BioD® [25] (**Figura 1.8**).

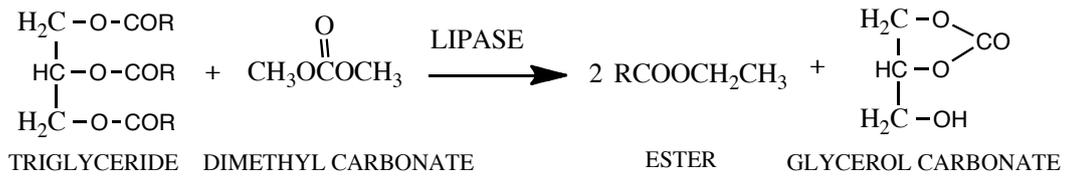


Figura 1.8. Esquema de reacción del DMC-BioD®, biocombustible obtenido por tecnología enzimática y patentado [25], que integra la glicerina como carbonato de glicerol.

De forma similar, el Gliperol® es otro nuevo biocarburoante, recientemente patentado [26], compuesto por una mezcla de tres moléculas de FAME y una molécula de triacetato de glicerol (*triacetina*). Se puede obtener después de la transesterificación de un mol de triglicérido con tres moles de acetato de metilo empleando una lipasa como catalizador [27]. Análogamente, con el acetato de etilo [28] se obtiene la correspondiente mezcla de FAEE con triacetina, según el proceso enzimático expresado en la **Figura 1.9**.

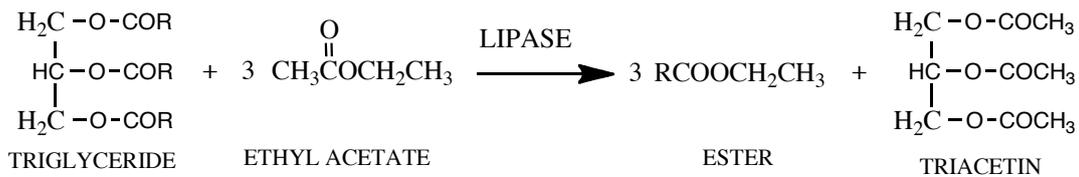


Figura 1.9. Esquema de reacción del Gliperol®, biocombustible obtenido por tecnología enzimática y patentado por el Industrial Chemistry Institute of Varsow (Polonia), que integra la glicerina como triacetina.

Así pues, DMC-BioD®, Gliperol® y Ecodiesel® tienen en común que todos incorporan la glicerina como un derivado (carbonato, triacetato o monoglicérido) capaz de formar mezclas monofásicas homogéneas, evitando la generación de residuos o subproductos en sus procesos de preparación. La principal diferencia con respecto al biodiesel convencional, es que en la producción de los mismos no se requieren procesos adicionales de separación.

El MG, DMC o la triacetina pueden ser perfectamente incorporados con la mezcla de FAME en los motores diesel. En términos de Química Verde, la incorporación de la glicerina en el biocombustible incrementa la eficiencia del proceso sin producir modificaciones sustanciales en las propiedades físico-químicas de los biocarburantes. La eficiencia atómica también mejora, dado que el número total de átomos que participan en la reacción es parte de la mezcla final que forma el biocombustible.

Por tanto, la utilización de lipasas, aprovechando su capacidad para obtener la alcoholólisis 1,3-regioespecífica de los triglicéridos con alcoholes de cadena corta, o empleando otros reactivos diferentes de los alcoholes, como carbonato de dimetilo o los acetatos de metilo o etilo, puede constituir a medio plazo un procedimiento competitivo, respecto al convencional basado en la catálisis homogénea básica, en la obtención de nuevos biocarburantes aplicables en motores diesel. Como ya se ha dicho, la incorporación de la glicerina reduce la complejidad del proceso, aumenta su rendimiento y reduce al mínimo la generación de residuos, y además, los procesos enzimáticos se llevan a cabo en condiciones comparativas mucho más suaves (o verdes) que las habitualmente empleadas para la producción de biodiesel (pH, temperatura, presión, etc.)

Las limitaciones existentes para la utilización industrial de las lipasas, debidas principalmente a sus altos costes de producción, podrían ser superadas mediante la aplicación de tecnologías para obtenerlas purificadas, en cantidades suficientemente elevadas, y/o en forma inmovilizada. Sin embargo, no hay que descartar, además, otra importante limitación del método enzimático, en comparación con los catalizadores básicos convencionales, que se refiere a la transesterificación de la posición 2 de los triglicéridos. En efecto, la producción de biodiesel convencional con lipasas debe tener en cuenta su carácter 1,3-regioselectivo por el cual hidrolizan selectivamente las posiciones 1 y 3 de los triglicéridos [29, 30]. Debido a lo anteriormente expuesto, la mayoría de los procesos enzimáticos de producción de biodiesel convencional que se han descrito, implican unos tiempos de reacción extremadamente largos y unas conversiones generalmente inferiores al 70 % en peso. En aquellos casos en que las conversiones son superiores, es

debido a la utilización de lipasas no selectivas o a un proceso paralelo, ampliamente descrito, de 1,2-acilmigración que se produce en los glicéridos en medio básico [31].

1.4

ENZIMAS

1.4.1

CARACTERÍSTICAS COMO BIOCATALIZADORES

Las enzimas son proteínas especializadas en la catálisis de las reacciones biológicas, cuyo interés reside principalmente en las siguientes características:

1) Las enzimas son *biocatalizadores* que disminuyen la energía de activación necesaria para que las reacciones se desarrollen y aumenten su velocidad de reacción (**Figura 1.10**). Presentan una actividad catalítica más eficaz que los catalizadores inorgánicos; por ejemplo, la energía necesaria para que se produzca la reacción de descomposición del agua oxigenada en agua y oxígeno es de 75 KJ/mol, en ausencia de catalizador; 50 KJ/mol, en presencia de platino y disminuye hasta 8 KJ/mol, en presencia de la peroxidasa. Este efecto tan drástico sobre la energía de activación en presencia de enzimas se debe a la formación de un complejo intermedio enzima-sustrato, que posteriormente se transforma en producto y enzima.

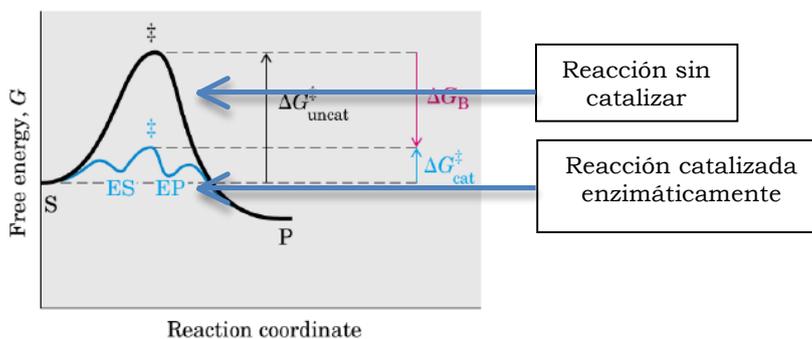


Figura 1.10. Efecto de la catálisis enzimática sobre la energía de activación de una reacción.

2) Las enzimas son *selectivas*, tanto para la reacción que catalizan, como para los sustratos que reconocen. Además, presentan un elevado grado de estereo y regioselectividad (en general, aceleran más el proceso con un isómero que con el otro, lo cual constituye una gran ventaja frente a los catalizadores químicos clásicos). La selectividad de las enzimas se debe a la formación del complejo enzima-sustrato, formado en una pequeña región de la enzima denominada centro activo, el cual suele estar localizado dentro de la estructura terciaria de la enzima. La especificidad enzimática reside en las propiedades de dicho centro activo (dimensiones, topología, alineamiento de grupos con iónicos y regiones hidrófobas), que condicionan las características que debe reunir un determinado sustrato para acoplarse en esa región enzimática. Solamente un número reducido de aminoácidos están implicados en la catálisis enzimática, los cuales no se localizan consecutivamente en la cadena polipeptídica, sino que se encuentran juntos tras el proceso de plegamiento enzimático.

La **Tabla 1.4** compara las energías de activación para la descomposición del peróxido de hidrógeno, en ausencia o presencia de un catalizador. Se aprecia cómo el catalizador enzimático disminuye aún más la barrera energética que ha de superarse desde el nivel de reactivos para alcanzar el estado de transición. El alto poder catalítico de las enzimas se debe en parte a su alta especificidad por los sustratos, la cuál puede ser absoluta para un único sustrato o relativa, cuando permite la reacción de compuestos diferentes pero con una estructura similar.

Tabla 1.4. Descomposición enzimática del agua oxigenada, comparación de las energías de activación para la descomposición del peróxido de hidrógeno, en ausencia o presencia de un catalizador.

(www.itescam.edu.mx/principal/sylabus/jpdb/recursos/r52038.PDF)

Reacción	Catalizador	Temperatura (°C)	Energía (Kcal/mol)
Descomposición de H ₂ O ₂	Ninguno	20	18
	Fe ²⁺	22	10
	Catalasa	22	1,7

Se han propuesto numerosos modelos para explicar la selectividad de las enzimas para un determinado sustrato. El modelo de "llave-cerradura" [32] ofrece una visión rígida de las enzimas y ha sido superado por el modelo de "acoplamiento o encaje inducido" [32, 33], por el cual el sustrato induce la orientación de los residuos en el centro activo para que se unan al centro de fijación y se desarrolle la reacción. La selectividad de las enzimas es la base de sus aplicaciones en Síntesis Orgánica, que permite llevar a cabo, por ejemplo, transformaciones muy selectivas con estructuras quirales y polifuncionales.

3) Las enzimas pueden ser objeto de *regulación*; es decir, su actividad catalítica puede estar determinada por la concentración de sustratos, productos y otras sustancias químicas presentes en el medio; las cuales pueden producir, tanto su activación como su inhibición.

4) Las enzimas *se degradan en condiciones relativamente suaves*, por lo que requieren una manipulación más delicada que los catalizadores químicos. Las enzimas se pueden desnaturalizar por diversos mecanismos como: la acción de proteasas, presentes como agentes contaminantes en las preparaciones enzimáticas; los cambios bruscos de las condiciones del medio que pueden alterar la conformación enzimática; las contaminaciones microbianas; los procesos de autooxidación, etc.

Algunos de los principales inconvenientes que presentan los procesos catalizados por enzimas (la inestabilidad, el precio elevado y la especificidad respecto a sustrato) se han podido superar mediante diferentes procedimientos como:

a) Transformación estereoselectiva de algunos sustratos, que conduce a la obtención de intermedios o productos de gran interés en Síntesis Orgánica.

b) El desarrollo de técnicas (como la inmovilización enzimática) que permiten mejorar la estabilidad de las enzimas y facilitar su posterior recuperación y reutilización [34-36], siendo posible la utilización de estas

enzimas como biocatalizadores en procesos industriales.

c) Los avances en Biología Molecular y las nuevas tecnologías del ADN recombinante han permitido la manipulación del material genético, el aislamiento de genes y su expresión con el fin de obtener determinadas enzimas en grandes cantidades [37-39]. Estas técnicas han permitido abaratar notablemente el precio de las enzimas y modificar selectivamente algunas propiedades enzimáticas.

d) La limitación debida a la insolubilidad de determinados sustratos en agua, que impedía el desarrollo de las reacciones enzimáticas, ha sido superada mediante la utilización de sistemas bifásicos [40] o la adición de pequeñas concentraciones de cosolventes orgánicos (etilenglicol, glicerol o dimetilsulfóxido), sin alterar las propiedades y características del biocatalizador [41,42].

1.4.2

EVOLUCIÓN HISTÓRICA

La denominación de enzima ("en la levadura") no se empleó hasta 1877, pero mucho antes ya se sospechaba que ciertos catalizadores biológicos intervenían en la fermentación del azúcar para formar etanol, de ahí el nombre inicial de fermentos. La primera teoría general sobre la catálisis química fue publicada en 1835 por J.J. Berzelius, el cual incluía en su artículo un ejemplo de lo que ahora se conoce como enzima, la diastasa de malta, y señalaba que la hidrólisis del almidón catalizada por la diastasa era más eficaz que la catalizada por ácido sulfúrico. Luis Pasteur en 1860 reconoció que la fermentación era catalizada por enzimas y en 1897 E. Büchner consiguió extraer de las células de la levadura las enzimas que catalizan la fermentación alcohólica. Sin embargo, fue en 1926 cuando J.B. Summer aisló por primera vez una enzima en forma cristalina; se trataba de una

ureasa aislada de extractos de la alubia *Cannavalia enzyformis*. Summer observó que estos cristales estaban constituidos por estructuras proteicas y llegó a la conclusión de que las enzimas eran proteínas. No obstante, sus puntos de vista no fueron aceptados hasta que Northrop, entre 1930 y 1936, aisló la pepsina, tripsina y quimotripsina cristalizadas [43].

1.4.3

CLASIFICACION Y NOMENCLATURA

Las enzimas se han clasificado sistemáticamente en seis clases principales [43], cada una de las cuales se divide a su vez en subclases, de acuerdo con el tipo de reacción catalizada por cada una de ellas (**Tabla 1.5**).

Las enzimas objeto de estudio en la presente tesis doctoral son varias lipasas que vienen definidas por el número E.C. 3.1.1.3, donde E.C. son las abreviaturas de Comisión de Enzimas, la primera cifra «3» representa el nombre de la clase (hidrolasa), la segunda cifra «1» representa a la subclase (enlace que hidroliza, esterasa), la tercera cifra «1» a la sub-subclase (esterasa que reconoce ésteres del glicerol) y la cuarta cifra «3» designa a la glicerol-éster-hidrolasa de ácidos de cadena larga.

Tabla 1.5. Clasificación internacional de enzimas (denominación de clases, números de código y tipos de reacciones) [43].

1. OXIDO REDUCTASAS (Reacciones de óxido-reducción)	1.1- Actúan sobre alcoholes >-OH
	1.2- Actúan sobre cetonas >C=O
	1.3- Actúan sobre alquenos >C=CH
	1.4- Actúan sobre grupos amino -NH ₂
	1.5- Actúan sobre grupos imino =NH
2. TRANSFERASAS (Transferencia de grupos funcionales)	2.1- Grupos de un átomo de C
	2.2- Grupos carbonilo
	2.3- Grupos glucosilo
	2.4- Grupos fosfato
	2.5- Grupos que contienen azufre
3. HIDROLASAS (Reacciones de hidrólisis)	3.1- Esteres
	3.2- Enlaces glucosídicos
	3.3- Enlaces peptídicos
	3.4- Otros enlaces C-N
	3.5- Anhídridos de ácido
4. LIASAS (Adición a dobles enlaces)	4.1- >C=C<
	4.2- >C=O
	4.3- >C=N-
5. ISOMERASAS (Reacciones de isomerización)	5.1- Racemasas
6. LIGASAS (Formación de enlaces con escisión de ATP)	6.1- Entre átomos de C y O
	6.2- Entre átomos de C y S
	6.3- Entre átomos de C y N
	6.4- Entre átomos de C y C

1.4.4

CATÁLISIS ENZIMÁTICA EN DISOLVENTES
ORGÁNICOS

Durante los últimos años el empleo de biocatalizadores en síntesis orgánica se ha convertido en una alternativa muy atractiva respecto a los métodos químicos convencionales [44]. En efecto, las enzimas incorporan a menudo una alta quimio, regio, y enantioselectividad que las convierte en valiosos catalizadores en el campo de la Química Fina. Además, las reacciones catalizadas por enzimas normalmente se llevan a cabo en condiciones suaves (temperatura ambiente y pH neutro), las velocidades de reacción aumentan notablemente, y son menos peligrosas, contaminantes y consumen menos energía que las metodologías químicas convencionales.

El tremendo potencial de las enzimas como catalizadores está ampliamente reconocido; sin embargo, cuando su empleo se restringe a su medio natural acuoso, su utilidad y alcance está limitado por una serie de consideraciones. Así, la mayoría de los compuestos orgánicos son insolubles en agua, pudiendo tener lugar reacciones colaterales no deseadas, el equilibrio termodinámico de muchos procesos es desfavorable en agua, y la recuperación de los productos es compleja, ya que el agua es un disolvente difícil de eliminar por su alto punto de ebullición y calor de vaporización.

En principio, muchos de los problemas se resuelven usando disolventes orgánicos en lugar de agua como medio de reacción. A primera vista tal sustitución parecería imposible debido a la idea convencional de que las enzimas (en general las proteínas) se desnaturalizan (pierden su estructura nativa y su actividad catalítica) en disolventes orgánicos. Sin embargo, esta noción proviene de examinar a las enzimas en mezclas de aguas con disolventes orgánicos y no en disolventes orgánicos puros. Las proteínas tienden a desnaturalizarse en las mezclas de agua con disolventes orgánicos porque tienen suficiente flexibilidad conformacional para ello; sin embargo, en presencia de disolventes orgánicos “secos” (en ausencia de agua, que actúa como lubricante molecular), donde su tendencia a desnaturalizarse es mayor,

las enzimas se mantienen muy rígidas al carecer de la flexibilidad necesaria para poder hacerlo [45]. Por ello, la conformación nativa de las enzimas se retiene en gran medida en disolventes orgánicos, de modo que muchas enzimas son capaces de catalizar reacciones en medios no acuosos [46], como ha quedado bien demostrado, durante los últimos 20 años, ya que la utilidad tecnológica de las enzimas se puede aumentar de forma espectacular [47].

Las transformaciones biocatalizadas en disolventes orgánicos ofrecen, entre otras, las siguientes ventajas [48]:

- 1) Posibilidad de efectuar la catálisis de reacciones que son desfavorables en agua.
- 2) Supresión de reacciones colaterales inducidas por el agua, como la hidrólisis de determinados grupos capaces de sufrirla, al emplear un medio orgánico.
- 3) Solubilización de determinados compuestos hidrofóbicos (insolubles en agua) en medios orgánicos y su aplicación como sustratos en procesos enzimáticos.
- 4) Recuperación más fácil de muchos productos debido a que no es necesaria una etapa de extracción en el proceso general de la reacción.
- 5) Recuperación más fácil de los biocatalizadores, al ser insolubles en disolventes orgánicos (tanto en forma libre como inmovilizada), mediante una simple filtración, permitiéndose en muchos casos su reutilización y reciclado.
- 6) Incremento de la termoestabilidad del biocatalizador, al menos mientras el contenido en agua se mantenga suficientemente bajo.
- 7) La selectividad enzimática puede verse afectada de forma importante, e incluso cambiar según el disolvente empleado.

1.4.4.1

ESTRUCTURA ENZIMÁTICA Y ESTABILIDAD EN
DISOLVENTES ORGÁNICOS

Se pueden distinguir dos tipos de inestabilidad enzimática de origen térmico. El primer tipo consiste en la pérdida gradual e irreversible de la actividad al degradarse la estructura primaria, al someter las enzimas a altas temperaturas. El segundo proviene de la pérdida de la estructura superior, catalíticamente activa, por el desplegamiento cooperativo de las macromoléculas enzimáticas, inducido por el calor. El agua es el principal responsable de ambos tipos de desactivación, ya que promueve la movilidad conformacional de las proteínas así como los diversos procesos degradativos [49]. Por tanto, cabría esperar que las enzimas fueran más termoestables en disolventes orgánicos que en agua. Esta predicción se ha demostrado experimentalmente con ejemplos como el de la lipasa pancreática de cerdo (PPL), que tiene una vida media de varias horas a 100 °C en disolventes anhidros, cuando en agua se desactivaría en unos segundos a esa temperatura [50]. La vida media de la enzima en un disolvente orgánico decrece bruscamente cuando se aumenta el contenido en agua.

Diversos trabajos, demuestran efectivamente que las enzimas son muy termoestables en disolventes orgánicos anhidros debido a la rigidez conformacional en el estado deshidratado y a la ausencia de las principales reacciones covalentes responsables de la inactivación térmica irreversible de las enzimas en disolución acuosa (hidrólisis de enlaces peptídicos, desamidaciones de residuos de Asn/Glu, intercambios de puentes disulfuro, β -eliminaciones en residuos de cisteína) [51].

Una de las formas típicas en las que se emplean las enzimas en medios no acuosos es como sólidos liofilizados. Se han llevado a cabo estudios mediante espectroscopía FTIR (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) que demuestran que la liofilización, que implica una deshidratación, provoca cambios reversibles en la estructura secundaria de las proteínas

produciéndose un incremento en el contenido en láminas β y un descenso en el de α -hélices [52]. Es importante tener en cuenta estos cambios producidos en la estructura secundaria a la hora de estudiar las diferencias en la actividad catalítica de las enzimas en agua frente a los disolventes orgánicos.

La integridad estructural de proteínas liofilizadas ha sido estudiada también por RMN en medio no acuoso [53] poniéndose de manifiesto que ciertos disolventes como el acetonitrilo, tetrahidrofurano, acetato de etilo o butanol no afectan a la proteína (no causan desnaturalización, aparte de la ya producida durante el proceso de liofilización).

1.4.4.2

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN DISOLVENTES ORGÁNICOS

La actividad enzimática en los disolventes orgánicos depende en gran medida de factores tales como la actividad termodinámica del agua [54-57], la solvatación del sustrato y el producto en el disolvente empleado, el control del pH, la forma enzimática y la naturaleza del disolvente.

1.4.4.2.1

VALORES DE pH Y SU CONTROL. EFECTO MEMORIA

El estado de protonación de los distintos grupos ionizables de una enzima es importante para la actividad enzimática, tanto en medios acuosos como en un disolvente orgánico. En agua, la ionización se puede controlar

mediante ajustes de pH, pero en medio orgánico la situación es más complicada, de hecho, en disoluciones no acuosas el concepto de pH no tiene un claro sentido [59]. Lo que sí se ha demostrado es que en los disolventes orgánicos las enzimas tienen “memoria de pH”, de modo que su actividad catalítica refleja el pH de la solución acuosa de la cual fueron recuperadas (mediante liofilización o precipitación). Este fenómeno se debe a que los grupos ionizables de la proteína retienen su último estado de ionización en el proceso de deshidratación (o precipitación) y el subsiguiente emplazamiento en los disolventes orgánicos (de ahí que se emplee el término “memoria”). Consecuentemente, la actividad enzimática en los disolventes orgánicos se puede mejorar mucho si la enzima se liofiliza (o precipita) a partir de su solución acuosa al pH óptimo para la catálisis.

1.4.4.2.2

FORMA ENZIMÁTICA

Las proteínas, si no reciben ningún tratamiento especial, son prácticamente insolubles en la mayoría de los disolventes orgánicos, incluyendo sistemas anhidros y aquellos con un porcentaje pequeño de agua disuelta. Por tanto, las enzimas suelen estar presentes en los disolventes orgánicos como suspensiones bifásicas sólido-líquido, lo cual simplifica la separación del producto-biocatalizador y la reutilización de la enzima. A continuación, se tratan las distintas formas en las que se puede emplear una enzima para biocatalizar procesos en medio no acuoso:

(a) En polvo.

La manera más simple de preparar un biocatalizador para su uso en un disolvente orgánico y, al mismo tiempo, ajustar los parámetros clave como el pH, es mediante la liofilización o precipitación de las correspondientes

soluciones acuosas (por ejemplo por adición de acetona). Sin embargo, estas preparaciones pueden dar lugar a limitaciones por difusión o impedir la interacción enzima-sustrato debido al apilamiento proteína-proteína. Para evitar este inconveniente se recomienda la utilización de partículas pequeñas de enzima obtenidas por sonicación, así como la agitación vigorosa durante la reacción.

La liofilización es un proceso físicoquímico, resultado de una congelación seguida de una sublimación y desorción [60]. Los cambios estructurales que se producen durante la liofilización de una enzima reducen su actividad catalítica en medio orgánico respecto al agua. Estos cambios son reversibles si la enzima liofilizada se vuelve a disolver en medio acuoso, pero no lo son (debido a la rigidez conformacional) si la enzima se suspende en disolventes orgánicos. Este efecto no deseado de desnaturalización parcial de la enzima puede minimizarse o incluso prevenirse si se lleva a cabo la liofilización de la misma en presencia de ciertos excipientes o aditivos (orgánicos e inorgánicos). Dichos excipientes promueven la activación de la enzima a través de diversos mecanismos [61].

(b) Inmovilizada.

La inmovilización reduce las limitaciones por difusión que presentan las enzimas suspendidas en disolventes orgánicos. Cuando la enzima está dispersa sobre la superficie del soporte sólido, el acceso a las moléculas individuales de la proteína se mejora, a la vez que se reduce la agregación de las partículas de proteína. Además, las enzimas, como las lipasas, que funcionan óptimamente en interfases se benefician del aumento de la superficie interfacial que conlleva la inmovilización de la proteína.

La adsorción de una enzima en un soporte macroscópico es la manera más sencilla y antigua de inmovilizar proteínas. Las fuerzas que intervienen en el proceso de adsorción son de distinta naturaleza (Van der Waals, interacciones electrostáticas y enlaces de hidrógeno), y relativamente débiles, por lo cual, las pérdidas de actividad enzimática generalmente son leves.

Además, la desorción de la proteína del soporte no puede ocurrir en disolventes no polares donde la proteína es totalmente insoluble.

El enlace covalente de una enzima a un soporte macroscópico da lugar a la formación de enlaces químicos estables entre ambos, lo cual evita completamente su separación aunque el biocatalizador se encuentre en agua. En muchas ocasiones, se requieren condiciones relativamente drásticas para llevar a cabo la inmovilización lo que da lugar a pérdidas de actividad inevitables (en torno al 50% respecto a la enzima nativa). Los grupos funcionales de la enzima implicados en la unión covalente son nucleófilos (grupos N-terminales y ϵ -amino de residuos de lisina, grupos carboxilo, hidroxilo, tiol y fenólicos).

El uso de enzimas en forma de cristales entrecruzados (*cross-linked enzyme crystals*, CLEC) es otra alternativa posible para la biocatálisis en disolventes orgánicos. Básicamente se trata de microcristales de enzima que son entrecruzados covalentemente (usualmente con glutaraldehído). Se trata de preparaciones muy robustas y estables a altas temperaturas en medio acuoso (donde tampoco son solubles). Además, las enzimas en forma CLEC son resistentes a la proteólisis, ya que las proteasas no penetran la matriz del cristal. Actualmente existen enzimas preparadas como CLEC disponibles comercialmente [62].

(c) Soluble

Para minimizar las limitaciones por difusión y maximizar las interacciones entre la enzima y el sustrato, se han empleado distintas estrategias para solubilizar los biocatalizadores en disolventes orgánicos. El método más conocido se basa en enlazar covalentemente el polímero polietilenglicol a las macromoléculas de enzima [63]. Los complejos así preparados dan lugar a soluciones transparentes, al emplearlos disueltos en diferentes disolventes orgánicos [64].

1.4.4.3

SELECTIVIDAD ENZIMÁTICA EN DISOLVENTES
ORGÁNICOS. INGENIERÍA DEL MEDIO

La selectividad es una de las principales propiedades de la catálisis enzimática y es intrínseca de la enzima. Para alterar la selectividad debe modificarse la molécula de enzima, por ejemplo mediante mutagénesis dirigida. Este concepto es correcto al referirse a una enzima que actúe en agua, pero deja de tener validez (en sentido parcial) si el proceso enzimático se lleva a cabo en disolventes orgánicos. De hecho, hay bastantes ejemplos en los que los distintos tipos de selectividad enzimática se modifican al pasar de un disolvente orgánico a otro, como la selectividad de sustrato, enantiomería, proquiral y la quimio- y regioselectividades [65].

El término “ingeniería del medio” se refiere a esta posibilidad de modificar las propiedades de una enzima determinada mediante un simple cambio de la naturaleza del disolvente en el que la reacción tiene lugar. El amplio abanico de disolventes orgánicos con distintas propiedades fisicoquímicas, como el momento bipolar, solubilidad, punto de ebullición, constante dieléctrica, cadena lineal o cíclica, etc, permite llevar a cabo estas modificaciones en la naturaleza del medio de manera sencilla.

Los datos descritos disponibles muestran que, para modificar o mejorar la selectividad enzimática, la ingeniería del medio representa una alternativa, o al menos, un complemento útil a la ingeniería de proteínas o a la laboriosa búsqueda de nuevos biocatalizadores. En general, se han planteado distintas hipótesis para justificar este fenómeno [66]. Por ejemplo, el disolvente en función de su polaridad podría modificar la conformación de la enzima en cierto grado y por tanto, influir en la selectividad al alterar el proceso de reconocimiento molecular entre la enzima y el sustrato. Otra hipótesis se basa en el hecho de que la selectividad depende de la energética de la solvatación del sustrato. Finalmente, hay modelos que afirman que las moléculas del disolvente podrían unirse al centro activo y, dependiendo de su estructura,

interferir con la asociación o transformación de, por ejemplo, un enantiómero más que otro.

1.4.5

INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS

En los últimos años la biotecnología ha experimentado grandes avances y, paralelamente, sus aplicaciones industriales en la obtención de productos químicos, alimentos y fármacos. Los procesos catalizados por enzimas en la industria son cada día más numerosos, ya que presentan una serie de ventajas frente a los catalizadores convencionales no biológicos, como son, una gran actividad catalítica, y especificidad de sustrato, y una alta actividad a temperatura ambiente y presión atmosférica. A pesar de estas claras ventajas, el empleo de las enzimas no se ha generalizado en los procesos químicos industriales debido a que la mayoría de ellas no son estables en las condiciones de trabajo, y al ser solubles en agua su separación de los sustratos y productos es difícil, y por tanto no se pueden reutilizar. La inmovilización de las enzimas permite en muchos casos superar estos inconvenientes, permitiendo que el proceso biotecnológico sea competitivo y económicamente rentable.

Inicialmente se consideró la inmovilización de enzimas a aquel proceso en el que se confina o localiza a la enzima en una región definida del espacio, para dar lugar a formas insolubles que retienen su actividad catalítica y que pueden ser reutilizadas repetidamente [67]. Posteriormente, esta definición se ha ampliado a aquel proceso por el cual se restringen, completa o parcialmente, los grados de libertad de movimiento de las enzimas, orgánulos, células, etc. por su unión a un soporte [68].

En general, el empleo de enzimas inmovilizadas presenta una serie de ventajas con respecto a la utilización de enzimas en disolución, ya que, no sólo mejoran de forma muy importante la economía del proceso, al poderse

reutilizar las enzimas, sino que también facilitan su manejo en los sistemas de reactores industriales. Así, de forma resumida se pueden destacar [69]:

- Posibilidad de adición y extracción de la mezcla reaccionante.
- Aumento de la actividad de la enzima, en muchos casos.
- Estabilidad a mayores intervalos de pH.
- Utilización de reactores enzimáticos de fácil manejo y control, adaptado a la aplicación de la enzima inmovilizada. Estos sistemas de reactores permiten el empleo de cargas elevadas de enzimas, que mantienen su actividad durante más tiempo, y el reciclado, que posibilita la obtención de productos con mayor pureza.
- Reutilización de la enzima.
- Posibilidad de trabajar a temperaturas más elevadas debido a la estabilización, con lo que se aumenta la velocidad de reacción y se evita la contaminación microbiana.

En lo que se refiere a las desventajas inherentes al empleo de las enzimas inmovilizadas, aparte de la dificultad intrínseca para mantenerlas activas, respecto a su empleo en disolución, en forma libre, podemos destacar:

- La alteración de la conformación de la enzima respecto de su estado nativo puede influir de forma negativa.
- La disminución de la productividad por unidad de peso o volumen. Esto es debido a que, en general, menos del 5 % de un sistema de enzima inmovilizada está constituido por la propia enzima, siendo el resto soporte inerte.
- La necesidad de utilizar soportes con un gran poder de adsorción, es decir, con una elevada superficie específica y alto número de centros activos superficiales, normalmente ácidos, sobre los que provocar la inmovilización. De ahí que, sea necesario desarrollar métodos más eficientes de inmovilización para reducir las limitaciones de las técnicas actualmente disponibles y para promover el empleo de las enzimas como catalizadores

suficientemente económicos para su aplicación, tanto a escala preparativa como a escala industrial.

A lo largo de las tres últimas décadas se han descrito diferentes métodos de inmovilización, sobre distintas estructuras insolubles que actúan como soportes. Así, existen numerosos métodos para conseguir la fijación de las enzimas a los soportes [70]. Como procedimientos de inmovilización más característicos [71], podemos destacar:

A) RETENCIÓN FÍSICA

A.1. Atrapamiento

Consiste en la retención física de la enzima en las cavidades interiores de una matriz sólida porosa constituida generalmente por prepolímeros fotoentrecruzables o polímeros del tipo poliacrilamida, colágeno, alginato, carraginato o resinas de poliuretano. El proceso de inmovilización se lleva a cabo mediante la suspensión de la enzima en una solución del monómero y la polimerización por un cambio de temperatura o adición de un reactivo químico. El atrapamiento puede ser en geles o fibras. En el primer caso la enzima queda atrapada en el interior de un gel, mientras que en el segundo la enzima se encuentra ocluida dentro de las microcavidades de una fibra sintética. Una ventaja adicional es que la enzima no sufre ninguna alteración en su estructura; sin embargo, el atrapamiento requiere un control riguroso de las condiciones de polimerización, así como la comprobación de que la naturaleza química del proceso no altera los grupos reactivos de la proteína.

A.2. Inclusión en membranas

Se puede dividir en dos tipos:

(a) Microencapsulación

En esta técnica las enzimas están rodeadas de membranas semipermeables que permiten el paso de moléculas del sustrato y producto, pero no de la enzima. Estas membranas semipermeables pueden ser permanentes o no permanentes. Las microcápsulas pueden ser esféricas

(poros de 1-100 μm \emptyset). Mediante este método se pueden encapsular simultáneamente una gran variedad de enzimas, células o biomoléculas, permitiendo que se lleven a cabo determinadas reacciones que suceden en múltiples pasos.

(b) Reactores de membrana.

El desarrollo de reactores o sistemas que contengan enzimas atrapadas ha despertado gran interés. Estos reactores emplean membranas permeables al producto final, permeables o no al sustrato inicial e impermeables a la enzima. Mediante una bomba se establece un flujo líquido de sustrato que atraviesa el reactor. En general, en esta metodología, se procede inicialmente a la adsorción de la enzima sobre la membrana que formará el reactor. Esta adsorción se puede realizar de dos formas: mediante el paso de una solución tamponada de enzima a través de la membrana y por contacto continuo de una solución de enzima con la membrana.

B) RETENCIÓN QUÍMICA A UN SOPORTE.

Son los métodos de inmovilización más utilizados y de los que se dispone de una mayor información. La elección del soporte y del tipo de enlace resultan determinantes en el comportamiento posterior del biocatalizador. Se debe procurar que la inmovilización incremente la afinidad por el sustrato, disminuya la inhibición, amplíe el intervalo de pH óptimo y reduzca las posibles contaminaciones. Además, el soporte debe tener resistencia mecánica a las condiciones de operación del reactor y ser fácilmente separable para la posterior reutilización. Así, los principales métodos son:

B.1. Unión de la enzima a la superficie del soporte por adsorción física.

La adsorción física fue la primera forma de inmovilización utilizada, ya que se basa en el mismo método empleado para la purificación de las enzimas. Éstas se adsorben sobre carbón, caolinita u otro soporte inorgánico, celulosas iónicas, o diversas resinas orgánicas de intercambio iónico, y se comprueba que, en mayor o menor medida, mantienen actividad enzimática. Ésta técnica

es la más fácil de efectuar, apenas produce desactivación y permite regenerar el soporte con enzimas frescas pero, en teoría, es la menos efectiva, ya que las enzimas, al no estar unidas con suficiente fuerza, se solubilizan muy fácilmente. No obstante, las primeras aplicaciones industriales de las enzimas se han basado en estos procedimientos [72].

En efecto, la primera aplicación industrial de las enzimas data del año 1969, en el que la compañía Tanabe Seiyaku incorpora por adsorción la enzima *penicilina-G acilasa*, o *aminoacilasa* (N-acilaminoácido hidrolasa, EC 3.5.1.14), procedente del *Aspergillus oryzae*, a una resina DEAE-Sephadex, y la utiliza en la resolución de mezclas racémicas de aminoácidos, obtenidos por síntesis química. La producción actual de L-aminoácidos, empleando este método, se cifra en más de 100.000 Tm anuales.

B.2. Encapsulamiento de la enzima en el retículo poroso de un polímero orgánico o de un material inorgánico, generalmente de tipo zeolítico.

La encapsulación de las enzimas, se puede llevar a cabo mediante dos procedimientos muy generales:

(a) Polimerización de un monómero orgánico, en un medio en el que se encuentran disueltas las enzimas (células o microorganismos) al que se adicionan iniciadores de la polimerización, por ejemplo acrilamida, o 1,6-hexametilendiamina y el cloruro del ácido hexanodioico, para producir, poliacrilamida o nylon 6.

De hecho, la resolución de mezclas racémicas de aminoácidos se sigue efectuando en diversas empresas con la misma enzima *penicilina-G acilasa*, pero atrapada en geles de poliacrilamida. Estos geles se preparan por diferentes tratamientos físicos de los polímeros ya formados. También se emplea el alginato de calcio, que se obtiene al gelificar el alginato de sodio en disoluciones de hidróxido de calcio, reteniendo las enzimas también en disolución.

(b) Precipitación de un gel, puramente inorgánico, en un medio en el que se encuentra disuelta la enzima. Así, se emplean diversos organosilanos, que por hidrólisis generan SiO_2 que, una vez "atrapadas", pueden incorporar diversas enzimas, por ejemplo lipasas [73]. En este sentido se observa un interés creciente sobre la preparación de materiales inorgánicos de porosidad controlada, más sofisticados, como pueden ser los tamices moleculares mesoporosos, tipo MCM-41. A éstos se pueden incorporar, por ejemplo, enzimas hidrolíticas: papaína y tripsina [74] o lipasas [75].

En general, los preparados enzimáticos, así obtenidos, suelen experimentar procesos de control de difusión por parte de los reactivos, ya que los retículos, orgánicos o inorgánicos, dificultan el acceso de aquéllos a los centros activos de las enzimas. Otro inconveniente es la imposibilidad de regenerar el preparado, por adición de enzimas "frescas".

B.3. Entrecruzamiento o reticulación de la enzima con reactivos bifuncionales, generando micro cristales que permiten una cierta heterogeneización del proceso.

El entrecruzamiento o reticulación de la enzima con reactivos bifuncionales (CLEC), se basa en emplear las enzimas cristalizadas y reticuladas con reactivos como el glutaraldehído que, formando enlaces imínicos con los restos ϵ -amino de las lisinas, mantienen estabilizados los cristales, mejorando no sólo su facilidad de manejo, sino aumentando de forma muy importante su actividad catalítica y estabilidad frente a la temperatura, disolventes y otros agentes desnaturizantes de las proteínas. Así, la termolisina, en CLEC, se ha aplicado con éxito a la producción industrial del edulcorante "aspartamo", trabajando a 55 °C, en acetato de etilo como disolvente [76].

Al igual que las enzimas inmovilizadas, los CLECs son insolubles en cualquier disolvente, por lo que se pueden recuperar, aumentan su estabilidad, y además poseen una mayor actividad por unidad de peso y/o volumen, ya que no contienen ningún soporte. Así, se ha descrito también la aplicación de lipasas CLEC en resoluciones de mezclas de enantiómeros, para

la obtención de antiinflamatorios no esteroideos: cetoprofeno, ibuprofeno y fluorbiprofeno [77]. Esta metodología, presenta claras ventajas (se encuentran disponibles comercialmente cinco enzimas CLEC: la *penicilinacilasa*, dos lipasas y dos proteasas), pero también, algunos problemas relativos al control de difusión, menor resistencia mecánica que las enzimas inmovilizadas, y sobre todo, que parece, en principio, inaplicable a las enzimas de mayor precio, ya que todo el "sólido" catalítico está formado por enzimas purificadas y cristalizadas.

B.4. Formación de un enlace covalente entre la enzima y el soporte.

La formación de un enlace covalente entre la enzima y el soporte supone, en principio, el método "ideal" para unir la enzima a un soporte, ya que, de darse una serie de condiciones, será el que mejor optimice la alta selectividad de las reacciones enzimáticas con las propiedades químicas y mecánicas del soporte, Así, las enzimas se fijan al soporte en su superficie, de forma aislada unas de otras, por lo que cada macromolécula enzimática puede actuar de forma individual, sin ninguna interferencia con las restantes, lo que le confiere la máxima eficiencia catalítica por unidad de peso de enzima y una importante reducción de las limitaciones debidas a la transferencia de masa, que es un inconveniente asociado a los restantes métodos de inmovilización. Este "aislamiento" les confiere además mayor resistencia a la desactivación en condiciones extremas de funcionamiento, pH, temperatura, etc., pudiéndose, además, almacenar durante largo tiempo sin perder su actividad, pues ésta se produce muchas veces como consecuencia de interacciones interenzimáticas.

La aplicación de un método de inmovilización por unión covalente conlleva efectuar un tratamiento de activación de los grupos químicos superficiales del soporte, para que sea posible la reacción de éstos con los grupos nucleófilos de las proteínas. La activación debe realizarse en condiciones drásticas, incompatibles con la estabilidad de las enzimas, por lo que la inmovilización se ha de efectuar una vez que el soporte ha sido activado. Además, la elección del soporte es un aspecto primordial, ya que debe conciliar la facilidad para poder introducir en su superficie un elevado número de grupos funcionales (capaces de reaccionar con determinados restos

nucleófilos de la cadena polipeptídica de la enzima) con sus propiedades químico-físicas y mecánicas.

A este respecto, la principal discriminación se produce al elegir entre un soporte inorgánico (vidrios porosos, sílice, alúmina, etc.) o un polímero orgánico, tipo poliestireno. En el primer caso tendremos mayores ventajas, respecto a su resistencia mecánica, frente al uso de disolventes orgánicos, etc., pero las dificultades para efectuar la inmovilización serán comparativamente mucho mayores, ya que es mucho más fácil conseguir la funcionalización de un polímero, que la de un sólido inorgánico.

En el primer caso servirá una resina tipo Merrifield, un poliestireno entrecruzado con divinilbenceno y con un determinado porcentaje de monómeros funcionalizados [78], como por ejemplo la p-vinil-bencilamina [79]. Un soporte de este tipo es poco resistente a los disolventes orgánicos, ya que se deforma (se "hincha"), y a las temperaturas elevadas. Sus mejores resultados se consiguen en disoluciones acuosas y a temperaturas bajas o no superiores al ambiente. No obstante, se han inmovilizado diversas proteasas sobre polímeros de este tipo, funcionalizados con Ar-CH₂-Cl, -SO₃⁻ ó -COOH, [80].

En la actualidad, el método más habitual para efectuar la activación de un soporte inorgánico pasa por la "silanización" de los grupos hidroxilos superficiales, con un organosilano. Ésto puede efectuarse por diversos métodos [81] (sol-gel, preactivación con cloro, postmodificación, etc.), pero el más habitual consiste en insertar una cadena hidrocarbonada (*grafting*), que contiene el grupo funcional con el que se efectuará la interacción con un determinado tipo de residuos de la enzima.

La reacción de activación empleada en el proceso de inmovilización dependerá tanto del tipo de soporte o matriz sólida empleada, como del tipo de enzima a inmovilizar, a fin de no comprometer ningún residuo que forme parte de los centros activos. Por ello, un gran número de métodos se basan en la unión de los grupos hidroxilos superficiales del soporte, previamente activados, con grupos ε-NH₂ de lisinas de la proteína enzimática, para la

formación de un enlace imínico, toda vez que estos restos no forman parte de los centros activos de las enzimas más habituales [82]. Así, soportes como la sílice, la alúmina o el cristal poroso, previamente funcionalizados con grupos amino por activación con γ -aminopropil-trietoxisilano (**Figura 1.11**), se han utilizado en la inmovilización de enzimas por sus excelentes propiedades mecánicas [83]. En muchos casos la introducción del grupo aldehído se efectúa uniendo glutaraldehído al soporte, previamente activado por silanización de los grupos hidroxilo superficiales [68, 84].

La tosilación se ha empleado en soportes como la agarosa, la sefarosa u otros polisacáridos, obteniéndose enzimas inmovilizadas que muestran mayor actividad que las libres [85], aunque las deficientes propiedades mecánicas de tales soportes dificultan el propio proceso de inmovilización [86]. No obstante, la utilización de grupos aldehídicos superficiales, para fijar enzimas mediante enlace covalente a los correspondientes soportes, es una de las técnicas más ampliamente descritas en la bibliografía [87].

Así, por ejemplo, una patente española [88], describe un método que emplea glicidol como activante, obteniéndose los grupos carbonilo a partir de la oxidación, con peryodato de los grupos hidroxilo vecinales formados [89], como se recoge en la **Figura 1.12**.

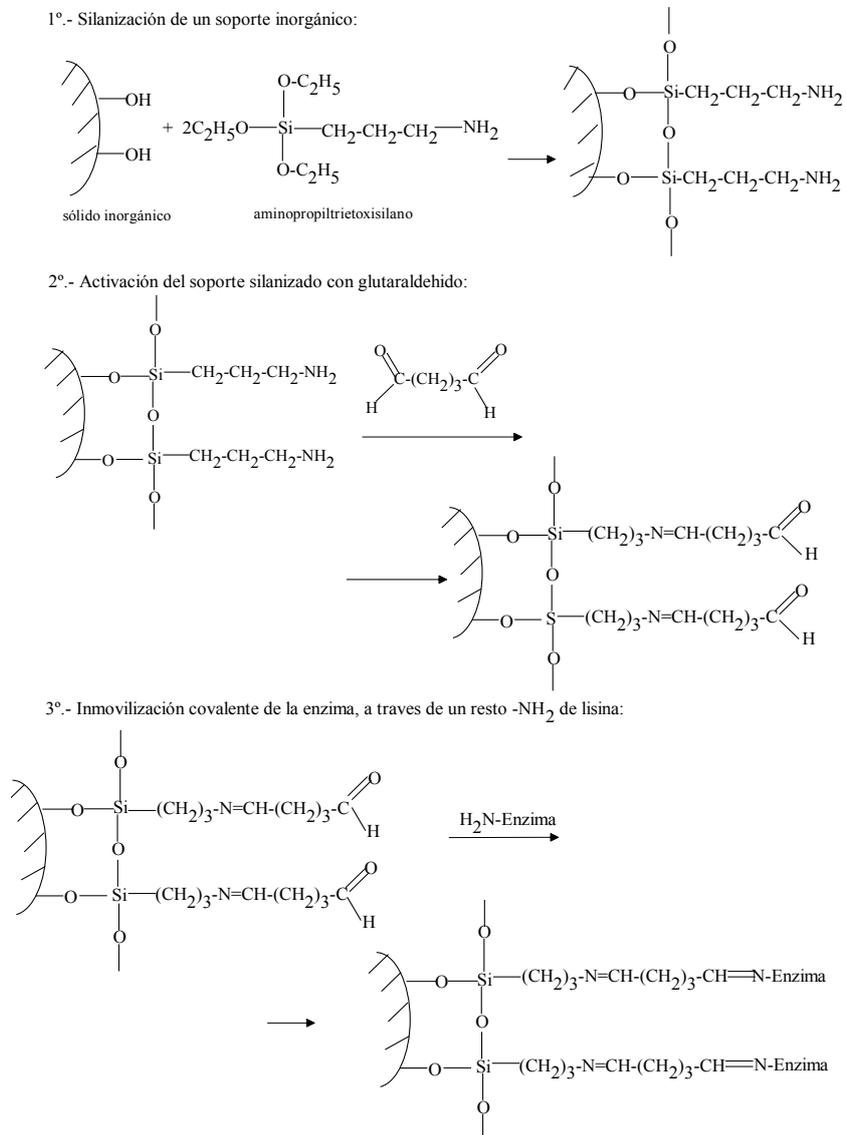


Figura 1.11. Inmovilización covalente de enzimas en soportes inorgánicos silanizados [83].

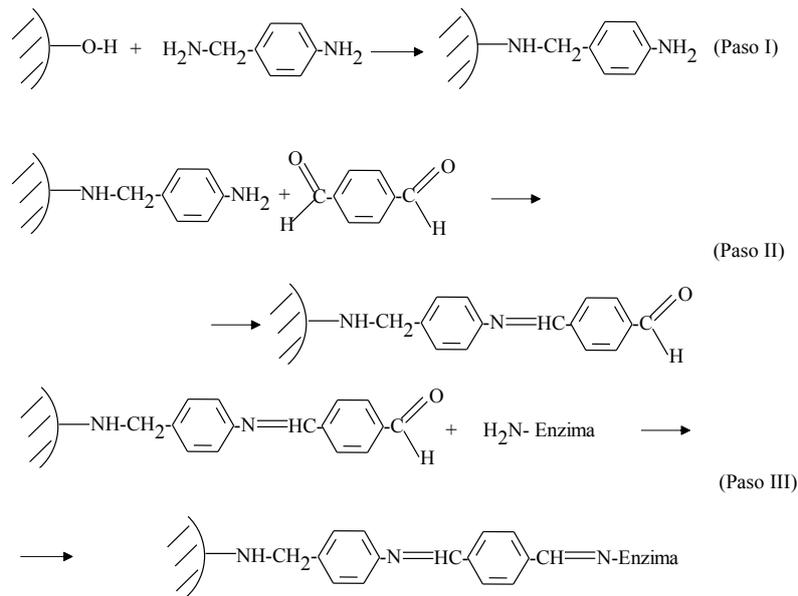


Figura 1.13. Esquema general de la inmovilización covalente de enzimas a través de los grupos ϵ -NH₂ de las lisinas. Activación del soporte por reacción con 4-amino-bencilamina, (Paso I); post-modificación por reacción con el aldehído tereftálico (Paso II) y unión covalente de la enzima (Paso III), [90-92].

Los resultados obtenidos han puesto de manifiesto que este método, al ser aplicado con diferentes enzimas y procesos presenta las siguientes *ventajas*:

- La manipulación de los derivados inmovilizados es sencilla.
- La carga de la enzima permanece constante después de la inmovilización.
- Los derivados pueden utilizarse en reactores en continuo, empaquetados, de lecho fluidizado o tanque agitado.
- La resistencia a la desactivación por el efecto de la temperatura, de los disolventes orgánicos o del pH, es mayor al tener estabilizada su estructura terciaria.

No obstante, la inmovilización por enlace covalente también presenta una serie de *inconvenientes*, que hay que tener en cuenta a la hora de aplicar este procedimiento:

- Es necesario conocer la densidad de los grupos activos por unidad de superficie, ya que condiciona el número de uniones enzima-soporte y su geometría, que puede ser distorsionante y conducir a derivados inactivos.
- El proceso de inmovilización puede alterar la estructura del centro activo. Para evitar esta posible alteración se realiza la inmovilización en presencia de un inhibidor que bloquee el centro activo.
- La inmovilización covalente no es aconsejable en aquellas enzimas muy sensibles a cambios de pH, fuerza iónica, etc.

1.4.5.1

EFFECTOS DE LA INMOVILIZACIÓN

A menudo, la inmovilización altera significativamente el comportamiento de las enzimas. En primer lugar, se producen cambios en su estabilidad y en segundo lugar, la enzima inmovilizada es un sistema heterogéneo en el cual todos los componentes que intervienen en el proceso catalítico (pH, sustratos, productos, inhibidores, cofactores, activadores, etc.) se encuentran en interfase: en el medio de reacción y en la fase constituida por el soporte con la enzima. Como consecuencia la actividad enzimática se ve afectada por problemas de tipo difusional, estérico y de microentorno.

1.4.5.1.1

EFECTOS EN LA ESTABILIDAD

La estabilidad de las enzimas, generalmente experimenta un incremento después de su inmovilización, debido sobre todo a que existen uniones multipuntuales enzima-soporte [93, 94]. Así, la estructura terciaria de la enzima adquiere mayor rigidez y se hace más resistente a la desactivación térmica o química. Este tipo de estabilización se obtiene únicamente en aquellos métodos en los que intervienen enlaces de tipo covalente. También se evita la agregación intermolecular al mantener las moléculas de enzima retenidas en una determinada región del espacio.

Por otro lado, existe una alteración del microentorno de la enzima debido a la interacción de la misma con el soporte [95]. En otros casos el soporte tiene un efecto tampón de tal manera que mantiene el pH óptimo de la enzima en su microentorno aunque en la disolución se produzcan cambios importantes de pH. Por otra parte, en aquellas reacciones catalizadas por enzimas inmovilizadas, en presencia de disolventes orgánicos, la hidrofilia del soporte o su capacidad de retener agua, regula la actividad de la enzima. Cuanto mayor es la hidrofilia del soporte, más agua adsorbe y la enzima poseerá la cantidad necesaria de agua en su microentorno para mantener su conformación activa [96].

La actividad de la enzima puede disminuir e incluso perderse tras su inmovilización. Si se pierde totalmente puede deberse a diversas razones: (i) la unión del soporte se produce de tal forma que impide el paso de sustrato al centro activo, (ii) los grupos reactivos del soporte reaccionan con algún aminoácido que forma parte del centro activo o que sea esencial para la actividad catalítica de la enzima, (iii) se produce un cambio conformacional que da lugar a una forma inactiva, y (iv) las condiciones experimentales del proceso de desnaturalización o desactivación de la enzima. Si la pérdida no es total, los cambios de actividad se deberán principalmente a efectos difusionales, electrostáticos, estéricos y/o del microentorno.

1.4.5.2

APLICACIONES INDUSTRIALES DE LAS ENZIMAS

La aplicación de las enzimas en los procesos industriales está en pleno desarrollo, y forma parte de la Biotecnología actual. Desde hace siglos se usan enzimas en las industrias alimentarias clásicas. Homero describe, en una de sus obras, el proceso seguido por los griegos para la elaboración del queso, removiendo la leche con una rama de higuera, ignorando que esta rama liberaba una proteasa que provocaba la coagulación de la leche. En 1875, Christian Hansen desarrolló la primera industria de producción de enzimas, obteniendo una preparación enzimática estandarizada, compuesta por una mezcla de quimotripsina, también denominada renina, y pepsina. Esta preparación se denominó cuajo y se utilizó en la preparación de los quesos. El desarrollo a gran escala de la industria de las enzimas se originó, en 1955, con la producción de la glucoamilasa, y tuvo su impulso definitivo con la utilización de las proteasas en la composición de los detergentes. A partir de ese momento, se iniciaron diversos frentes de investigación acerca de las enzimas y su utilización. Actualmente, el uso de enzimas en los procesos industriales está muy generalizado, encontrándose, tanto preparados parcialmente purificados, que pueden obtenerse a precios moderados, como puros, que alcanzan en algunos casos precios tan elevados que sólo permiten adquirir unos pocos miligramos, de ahí la importancia de lograr la inmovilización de las mismas [97].

En el caso de las enzimas inmovilizadas, las aplicaciones actuales más importantes se pueden clasificar en las siguientes:

1. Aplicaciones analíticas.

Los biosensores se están convirtiendo en una herramienta imprescindible en campos muy diversos como medicina, control de calidad de los alimentos y control medioambiental. En principio, se puede diseñar un biosensor para cualquier tipo de compuesto que sea capaz de interactuar específicamente con un sistema biológico. El biosensor contiene una molécula

biológica inmovilizada (enzimas, células, anticuerpos) próxima a un traductor que en contacto con el analito transformará la señal química en una señal eléctrica o de otro tipo. Posteriormente, dicha señal será amplificada y digitalizada. Los métodos de inmovilización más empleados en el diseño de biosensores son la inclusión en membranas semipermeables y la unión covalente a membranas. En ambos casos las enzimas inmovilizadas van adheridas a la superficie sensible del electrodo [98].

2. Aplicaciones médicas.

Existen muchas enfermedades causadas por una alteración o carencia de una determinada enzima. El tratamiento con enzimas inmovilizadas, con efectos sustitutivos o terapéuticos, como son, una actividad antitumoral, o cicatrizante, entre otras muchas, permitiría una acción más prolongada y eficaz.

3. Aplicaciones en la industria farmacéutica.

La industria farmacéutica utiliza moléculas estructuralmente complejas y, en muchos casos, moléculas quirales. El empleo de enzimas inmovilizadas es una alternativa real a la síntesis "por pasos", donde no convenga trabajar a temperaturas elevadas o se requiera una elevada especificidad de sustrato. Las enzimas son catalizadores quirales estrictos, es decir, biocatalizadores con una estructura tridimensional asimétrica definida, que permiten la obtención de productos de gran pureza óptica. Se trata de una ventaja fundamental cuando las reglamentaciones exigen la síntesis de compuestos ópticamente puros, ya sean fármacos, hormonas o antibióticos.

4. Aplicaciones en la industria alimentaria.

El uso de enzimas en el procesado, preparación y conservación de alimentos, está muy extendido. Normalmente, las enzimas solubles añadidas son inactivadas por calentamiento una vez que el tratamiento ha concluido. En ocasiones se permite que continúe su actividad para que los alimentos

desarrollen el aroma y la textura deseados, pero nunca se reutilizan. La inmovilización permite que las enzimas puedan ser reutilizadas repetidamente en operaciones continuas o discontinuas. Obviamente, existen limitaciones a su empleo relacionadas con los requisitos económicos y sanitarios inherentes al procesado de alimentos [99].

5. Tratamiento de aguas residuales.

En la actualidad existe una gran posibilidad de utilización de enzimas inmovilizadas en la descontaminación de aguas residuales, ejemplos de ello son el desarrollo de un método para la reducción de nitratos a nitritos en aguas residuales que emplea enzimas inmovilizadas [100] ó la degradación de benceno (contaminante muy tóxico) mediante células de *Pseudomonas putida* atrapadas en geles de poliacrilamida [101].

6. Producción de biodiesel.

Las debilidades asociadas al procedimiento actual de producción de biodiesel, mediante catálisis homogénea en medio básico (el elevado consumo de agua de lavado, el tratamiento previo a la transesterificación, la obtención de glicerina de baja calidad, etc.), podrían ser superadas mediante la utilización de *lipasas* inmovilizadas y/o de relativamente bajo costo, ya que esto permitiría, no sólo la reutilización de las enzimas, sino que facilitaría también el procedimiento experimental para el aislamiento y purificación de los productos de la reacción.

Sin embargo, hasta el momento, a pesar de la gran cantidad de estrategias descritas en la bibliografía, el elevado precio de las lipasas y/o la ineficiencia de los métodos de inmovilización han hecho comercialmente inviable los intentos de aplicar a escala industrial el procedimiento enzimático (tanto en forma libre como fijadas por diversos métodos), y de ahí, la necesidad de conseguir mejoras importantes en estos procedimientos de inmovilización.

1.4.6

ESTRUCTURA Y MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS LIPASAS

Las lipasas son enzimas lipolíticas activas cuando están adsorbidas sobre una interfase oleo-acuosa o en su defecto oleo-polar, fenómeno que recibe el nombre de “*activación interfacial*” [102]. Ésta es la diferencia fundamental con las esterasas, que catalizan el mismo tipo de reacciones, pero en medio acuoso. Por esta razón, la utilidad principal de las lipasas reside en la posibilidad de actuar sobre sustratos apolares, que solo son solubles en medios hidrófobos.

Las lipasas son una de las familias de enzimas más estudiadas y empleadas en los procesos industriales [103]. Además de las reacciones de hidrólisis que catalizan, en condiciones de baja actividad de agua, son capaces de llevar a cabo reacciones no hidrolíticas: esterificaciones, transesterificaciones o interesterificaciones (**Figura 1.14**).

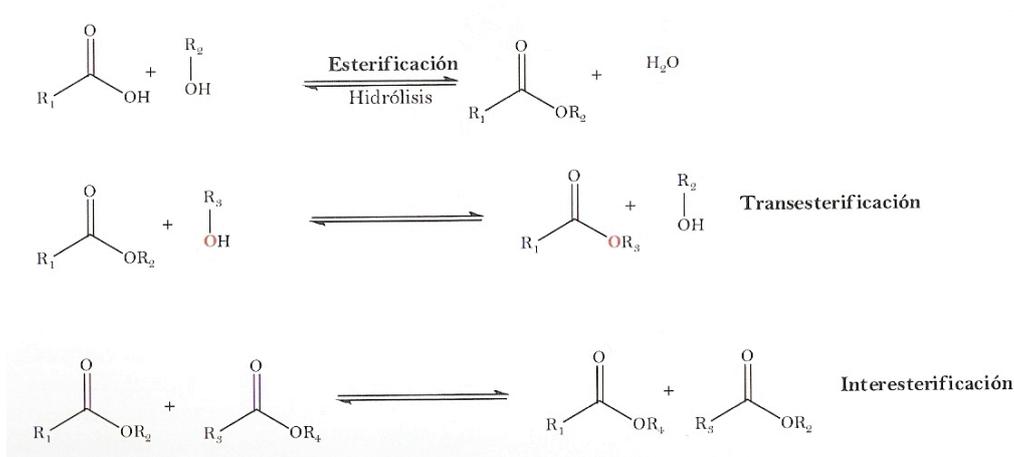


Figura 1.14. Reacciones catalizadas por las lipasas.

1.4.6.1

ACTIVACIÓN INTERFACIAL

Durante décadas se ha discutido mucho acerca de las bases moleculares del fenómeno de la “activación interfacial” de las lipasas. Este fenómeno se produce gracias a la presencia de una “tapadera” (*lid*) en la estructura de la mayor parte de ellas. La tapadera se encuentra formada por un bucle o por una o dos hélices α , con naturaleza anfipática, que se dispone en la superficie de la enzima bloqueando el centro activo y evitando la entrada de los sustratos en su conformación “cerrada”. Cuando la enzima se encuentra en la interfase lípido-agua se produce un cambio conformacional que desplaza la tapadera a su conformación “abierta” (**Figura 1.15**). Este hecho provoca un aumento de la hidrofobicidad en la entrada al centro activo que favorece el acceso del sustrato al mismo, provocando un aumento significativo de la actividad conocido como activación interfacial. Sin embargo, existen lipasas que no manifiestan esta activación interfacial aunque posean tapadera, como por ejemplo las lipasas procedentes de *Candida antarctica*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Burkholderia glumae* [104].

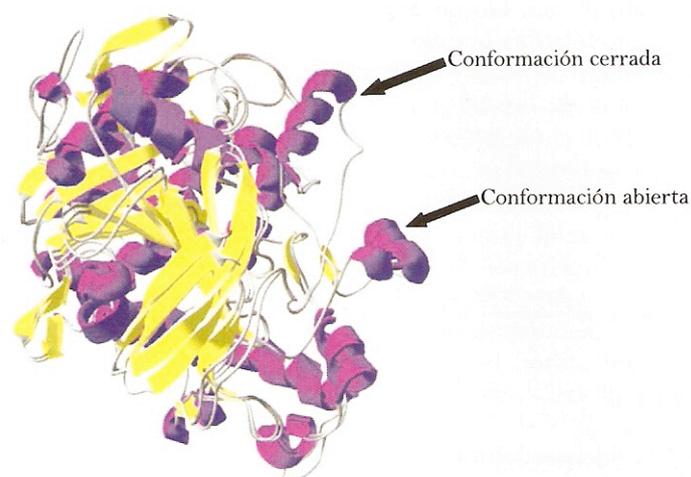


Figura 1.15. Estructura cristalina de la lipasa de *Candida rugosa* en sus conformaciones cerrada y abierta. Pueden verse en morado las hélices alfa y en amarillo las láminas beta.

Las lipasas, en general, presentan un plegamiento típico de las α/β hidrolasas, una estructura formada por 8 láminas β (generalmente dispuestas de forma paralela) interconectadas por hélices α . El centro activo de estas enzimas se encuentra formado por tres aminoácidos no continuos, denominados triada catalítica, cuya posición suele encontrarse conservada: una serina nucleófila, un ácido aspártico o glutámico y una histidina. La Ser catalítica se encuentra incluida en un pentapéptido conservado Gly(Ala)-X-Ser-X-Gly que se sitúa entre la lámina $\beta 5$ y la siguiente hélice α , cuya función es orientar y estabilizar la serina. Además de la triada catalítica, existen otros aminoácidos que intervienen en el proceso de catálisis estabilizando el intermedio de reacción mediante enlaces de hidrógeno y configurando la estructura conocida como “hueco oxianiónico” (*oxyanion hole*).

1.4.6.2

MECANISMO DE REACCIÓN DE LAS LIPASAS

El mecanismo de reacción de las lipasas se produce en cuatro etapas, durante las cuales existe un intercambio de cargas: (1) el ataque del grupo nucleófilo de la serina al enlace éster, formándose un intermedio tetraédrico entre el ácido graso y la serina; (2) la translocación de la carga negativa sobre el oxígeno de la serina al carbono carbonílico provoca la formación del oxianión; (3) la cesión de un protón de la histidina al alcohol, provocándose su liberación y la formación del complejo acil-enzima; y (4) el ataque de otro nucleófilo (H_2O o un compuesto hidroxilado) sobre el carbono carbonílico causa la liberación del ácido graso y la recuperación del centro activo (**Figura 1.16**).

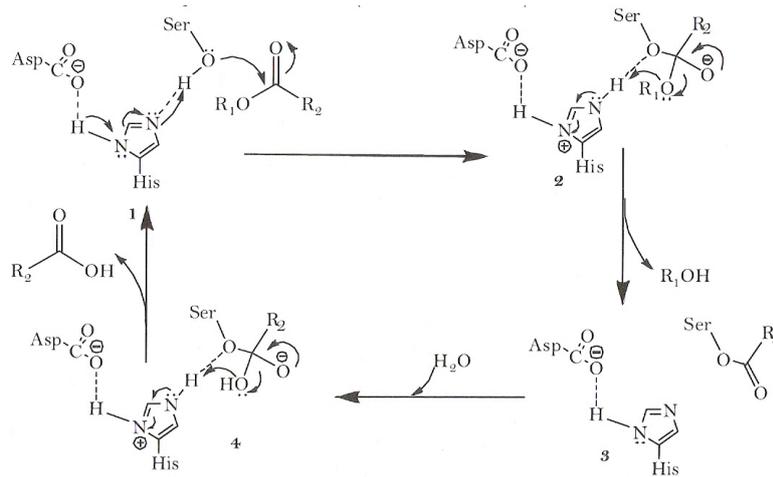


Figura 1.16. Mecanismo de reacción genérico de las lipasas.

Entre las aplicaciones en la industria alimentaria, que es uno de los mayores campos de utilización, destacan la obtención de lípidos estructurados [105], la interesterificación de grasas para la obtención de margarinas, la maduración de quesos y la obtención de aromas [106].

El problema del uso de las lipasas en los procesos sintéticos es la necesidad de utilizar disolventes orgánicos, en los cuales estas enzimas no son solubles y además se inactivan. Para solventarlo se han desarrollado, tanto métodos de inmovilización de enzimas, como métodos de utilización de las lipasas en sistemas sin disolvente (*solvent free system*), cuando el proceso lo permite, como es el caso de la producción de biodiesel [107 -110].

1.4.7

EFECTO DEL AGUA EN LA ACTIVIDAD CATALÍTICA

El medio biológico de actuación de las enzimas es el agua, ya que participa directa o indirectamente en todas las interacciones no covalentes (interacciones electrostáticas, enlaces de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals) [111], que permiten el mantenimiento de la conformación nativa, y por tanto, catalíticamente activa de las enzimas [112, 113]. Además, se ha comprobado que aunque las enzimas mantienen perfectamente su actividad y conformación en un medio orgánico, se pueden inactivar si se elimina todo el agua del medio, ya que el disolvente orgánico captará moléculas de agua de la enzima. Por tanto, la cuestión que hay que plantearse no es si las enzimas necesitan agua, sino cuanta agua necesitan para mantener su conformación activa en un determinado medio de reacción.

Además, las transesterificaciones de aceites y grasas, son reacciones en las que el contenido de agua en el medio de reacción es un parámetro esencial, ya que la presencia de agua puede favorecer la hidrólisis tanto de los reactivos como de los productos de reacción (ésteres), además de aportar un microentorno de hidratación adecuado para que la enzima conserve su forma activa. Debido a esto, es importante evaluar la influencia del contenido de agua del medio de reacción en el progreso de la reacción.

2.

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Este capítulo está dividido en tres apartados en los cuales se describen, en primer lugar, los métodos analíticos utilizados en la caracterización de las materias primas y de cada uno de los productos de las reacciones, así como de los tratamientos intermedios, en su caso. Además, se detallan los instrumentos y aparatos utilizados, y las metodologías seguidas para la realización de todos los ensayos llevados a cabo. Se describe el método cromatográfico utilizado, que tiende a simplificar el método oficial para la determinación de estos componentes.

En segundo lugar, se trata la síntesis, funcionalización, activación y caracterización superficial de los soportes utilizados en la inmovilización de las lipasas seleccionadas.

Finalmente, se describe el diseño experimental utilizado en la mayoría de los estudios, así como los modelos utilizados para relacionar las variables dependientes con las independientes y evaluar qué variables son las más influyentes para optimizarlas al mismo tiempo.

2.1

MÉTODOS DE ANÁLISIS

En la industria del biodiesel, al igual que en otras muchas, el análisis químico está ligado íntimamente al proceso general de fabricación. La función más importante de los análisis químicos es la de valorar la composición de las materias primas y de los productos obtenidos.

En este apartado se hace referencia a los diferentes parámetros utilizados en la caracterización de las materias primas, como son la humedad y el grado de acidez, así como el procedimiento de preparación de las muestras. También se trata la caracterización de los productos de la reacción, comprobando la presencia de jabones, calculando la viscosidad cinemática y determinando los contenidos de los compuestos presentes en las muestras de biodiesel (ésteres alquílicos, monoglicéridos, diglicéridos, triglicéridos y glicerol libre).

Es importante destacar la determinación de la viscosidad cinemática de la muestra de biodiesel, al ser el parámetro que en última instancia permite que el combustible sea utilizable en motores, ya que están diseñados para operar con combustibles con un rango concreto de viscosidades cinemáticas. Si se utilizan biocombustibles con viscosidad elevada se producen pérdidas de potencia y una mala combustión, mientras que si la viscosidad es demasiado baja se genera una mezcla demasiado rica en combustible y la combustión es deficiente.

2.1.1

CARACTERIZACIÓN DE LA MATERIA PRIMA

En este apartado se realiza una descripción de los diferentes métodos utilizados en la caracterización de la materia prima, como son la determinación de la humedad y del grado de acidez.

Las materias primas usadas en la presente tesis doctoral han sido aceite de girasol comercial y grasa animal procedente de residuos de matadero tras un tratamiento hidrotérmico.

2.1.1.1

DETERMINACIÓN DE HUMEDAD

La humedad de la materia prima se determina mediante un ensayo por el cual la muestra se calienta en una estufa a vacío hasta que la pesada es constante. Para ello, se tara un vaso de precipitado, bien seco; se anota su peso y se añaden entre 35 - 45 g de muestra. Se introduce en un dispositivo que permite calentar a vacío, manteniendo una temperatura constante a 100 °C durante 24 horas. Pasado este tiempo y una vez frío, se pesa. Se repite el procedimiento hasta obtener una pesada constante.

El contenido en humedad se obtiene de la diferencia de pesos y se expresa en tanto por ciento.

2.1.1.2

DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE ACIDEZ

La determinación del índice o grado de acidez es una medida del contenido de ácidos grasos libres en el material de partida. Dicha medida es de gran importancia en la producción de biodiesel convencional, ya que el procedimiento de catálisis básica utilizado hace que en presencia de ácidos libres se produzca la desactivación del catalizador y la formación de jabones.

En el método enzimático, los ácidos libres pueden afectar negativamente dependiendo de la enzima en estudio, ya que según sea la lipasa utilizada, será capaz con más facilidad de llevar a cabo reacciones de transesterificación de glicéridos y/o de esterificación de ácidos grasos.

Para determinar el grado de acidez se ha seguido el procedimiento descrito en la norma ISO 660. Para ello se pesan entre 2.5 - 10 g de muestra, dependiendo de la acidez esperada, y se disuelven en 50 - 150 ml de una solución (1:1 v/v) de etanol-éter etílico (Panreac), previamente neutralizada. Se lleva a cabo una volumetría valorando con una disolución de KOH 0.1 N, previamente estandarizada, (Licor acidimétrico valorado, Panreac) y la adición de unas gotas de una solución de 10 g/L de fenolftaleína en etanol, hasta el cambio de color violeta que indica el punto final de la valoración. La acidez se expresa como porcentaje en ácido oleico.

2.1.2

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA LAS REACCIONES

La preparación de las muestras para los ensayos de determinación de la eficiencia de los sistemas enzimáticos comienza con la pesada de 0.01 mol de materia grasa de partida, cuyo peso dependerá de la composición de ácidos grasos del material. En el caso del aceite de girasol comercial utilizado, se ha tomado como estándar que 0.01 mol = 9.1 g de aceite. Las pesadas se realizan en una balanza de precisión Mettler AJ50 (precisión de ± 0.01 g), depositando la muestra directamente en un matraz de fondo redondo de dos bocas de 50 ml de capacidad.

En dicho matraz se llevan a cabo directamente las reacciones de transesterificación para la determinación de la eficiencia de los biocatalizadores. Así, una vez se tiene la materia grasa en el matraz, se adiciona la correspondiente cantidad de etanol, que dependerá de la relación molar estudiada, la cantidad necesaria de una disolución acuosa de NaOH y la cantidad de agua necesaria en el medio de reacción. Cuando el matraz contenga todos los reactivos necesarios, se introduce durante el tiempo necesario en un baño de agua termostatzado para que se alcance la temperatura de trabajo. Se pesa y añade rápidamente la cantidad necesaria de

enzima al matraz de reacción, comenzando en este mismo instante la agitación de la mezcla y tomándose como tiempo de inicio de la reacción. Las reacciones tienen lugar en diferentes condiciones controladas de agitación y temperatura, mantenidas con un agitador magnético convencional y un baño termostático respectivamente.

La **Figura 2.1** muestra el sistema empleado para llevar a cabo las reacciones de transesterificación enzimática. El progreso de la reacción se sigue cromatográficamente, durante el tiempo necesario, tomando muestras directamente del matraz de reacción a través de una de sus bocas para su posterior análisis.

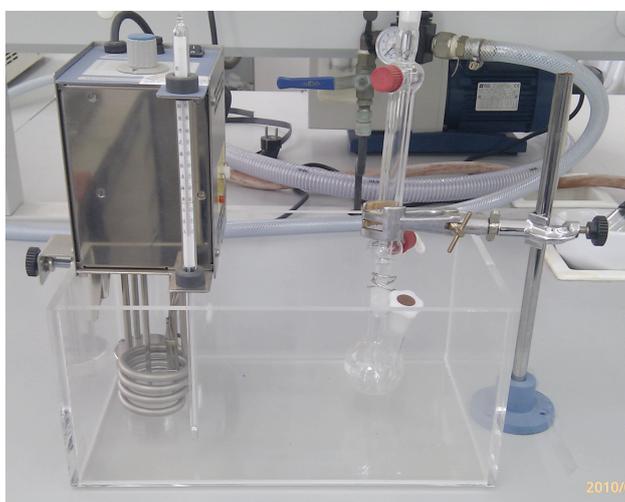


Figura 2.1. Dispositivo experimental utilizado para llevar a cabo las reacciones de transesterificación enzimática de aceites para la obtención de biodiesel.

2.1.3

CARACTERIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE REACCIÓN

La reacción de transesterificación de aceites y grasas con un alcohol de cadena corta como etanol puede dar lugar a varios productos, por ello es necesario caracterizar esta mezcla, ya que de su composición dependen las propiedades que presenta el biocombustible. Así, un alto contenido en triglicéridos y diglicéridos indica que la reacción ha avanzado poco, ya que son productos intermedios de la transesterificación total. Por el contrario, un alto contenido en monoglicéridos y ésteres etílicos, desvelan un gran avance de la extensión de la reacción y unas buenas propiedades para el uso de la mezcla como biocombustible, ya que los altos contenidos en ésteres y monoglicéridos hacen que la mezcla presente bajas viscosidades y mejores propiedades de combustión, así como lubricantes.

2.1.3.1

ENSAYO DE PRESENCIA DE JABONES

La comprobación de la presencia de jabones se lleva a cabo mediante un ensayo cualitativo. Para ello, se toman unos 2.5 - 5 g de muestra y se le añade aproximadamente la misma cantidad en volumen de acetona acuosa al 1 % y unas gotas de disolución de azul de bromofenol y se agita violentamente. Una tonalidad azul-violeta indica la presencia de jabones, y una tonalidad amarillo-verdosa indica su ausencia. De esta manera puede descartarse la formación de jabones durante la reacción de transesterificación.

2.1.3.2

VISCOSIDAD CINEMÁTICA

La viscosidad es el parámetro esencial a modificar en una reacción de transesterificación de aceites para obtener biodiesel. Para poder utilizar el biodiesel como combustible en los actuales motores Diesel es necesario que la viscosidad del biocombustible, o la mezcla final diesel-biodiesel, se encuentre en un rango de 3.5 - 5 mm²/s (UNE EN ISO 3104). Por tanto, la correcta determinación de la viscosidad es crítica para evaluar la calidad del biocombustible obtenido, ya que unos valores inadecuados de este parámetro pueden afectar decisivamente al buen funcionamiento del motor.

En esta Memoria nos referimos a la viscosidad cinemática, entendiéndose por viscosidad la resistencia que ofrecen las capas de una masa líquida para el desplazamiento paralelo de unas sobre otras. La viscosidad dinámica (η) es la fuerza necesaria, expresada en dinas, para que dos láminas del líquido, con una superficie de 1 cm² y separadas entre sí 1 cm, se desplacen paralelamente a la velocidad de 1 cm/s. Su unidad es el Poise (P), cuyas unidades son g/cm.s. Se emplea como submúltiplo el centipoise (cP). Así, la viscosidad cinemática (ν), representa el cociente entre la viscosidad dinámica y la densidad (ρ), $\nu = \eta/\rho$. Su unidad es el Stoke (St), cuyas unidades son cm²/s. Se emplea como submúltiplo el centistoke (cSt), que equivale a mm²/s.

La viscosidad se ha medido en un viscosímetro capilar Ostwald-Cannon-Fenske (Proton Routine Viscometer 33200, size 150), determinando el tiempo necesario para que un cierto volumen de líquido pase entre dos puntos marcados en el instrumento, colocado en posición vertical, (**Figura 2.2.**). Esto constituye una medida de la amortiguación que sufre el flujo del líquido, como consecuencia del frotamiento interno de sus moléculas, en función de su viscosidad, siempre que se mantengan constantes las variables que influyen en el proceso, principalmente la temperatura. A partir del tiempo de flujo (t), expresado en segundos, se obtiene la viscosidad cinemática expresada en centistokes, $\nu = C \cdot t$. C es la constante de calibración del sistema de medida en

mm^2/s^2 , que viene dada por el fabricante del aparato ($0.040350 \text{ mm}^2/\text{s}^2$ a $40 \text{ }^\circ\text{C}$, en este caso).

Para las medidas de viscosidad se sigue el procedimiento descrito en la Norma Española UNE 55-105-73. La muestra, previamente filtrada a $50 \text{ }^\circ\text{C}$, se sumerge en un baño termostatzado a $40 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 15 minutos, asegurándonos de que la temperatura es estable. Posteriormente se introduce la muestra en el viscosímetro y éste, a su vez, en el baño termostático, cuidando que esté situado en posición rigurosamente vertical, con el extremo inferior a una distancia mínima de 2 cm del fondo del baño. Se espera el tiempo necesario para que se establezca el equilibrio térmico, y una vez alcanzado, mediante un tubito de goma se succiona haciendo subir el nivel de la muestra hasta alcanzar unos 5 mm por encima de la primera marca del viscosímetro. Se interrumpe la succión, dejando que el líquido descienda libremente en el instrumento, poniendo en marcha el cronómetro en el momento en que el menisco superior pasa por la marca entre los dos bulbos, y parando el cronómetro en el momento que el menisco alcance la segunda marca. Se anota el tiempo de flujo, expresado en segundos. Se repite esta operación dos veces.

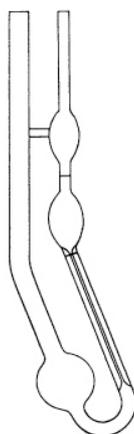


Figura 2.2. Viscosímetro de Ostwald-Cannon-Fenske.

Todas las medidas se han llevado a cabo por duplicado y se presentan como la media de ambas, comprobándose que no exista una variación mayor del 0.35 % entre medidas, como exige la norma UNE 55-105-73.

2.1.3.3

DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE FAEE Y GLICÉRIDOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE GASES

La determinación del contenido de ésteres etílicos y glicéridos en las muestras de biodiesel se ha realizado por un método cromatográfico puesto a punto en el transcurso del presente trabajo.

Se ha utilizado un cromatógrafo de gases HP 5890 Series II, conectado a una columna capilar HT5 (25 m x 0.32 mm I.D x 0.1 μ m, SGE, Supelco) con un detector de Ionización por llama (FID) e inyección *splitless*. Este método consiste básicamente en una modificación e integración de dos métodos oficiales, UNE EN ISO 14103 (ésteres) y UNE EN ISO 14105 (glicéridos), usando como patrones internos: butanotriol (> 99.9 % Sigma Aldrich), heptadecanoato de metilo (> 99.5 % Fluka) y tricaprina (> 99.9 % Sigma Aldrich), para cuantificar el contenido de glicerol, ésteres etílicos y glicéridos (-mono, -di y triglicéridos), respectivamente. Las condiciones cromatográficas usadas fueron las indicadas en la **Tabla 2.1**.

Tabla 2.1. Condiciones cromatográficas empleadas en la determinación de ésteres etílicos y glicéridos en las muestras de biodiesel.

Gas portador	Helio, flujo 1.5 mL/min
Modo Inyección	<i>Splitless</i>
Temperatura Inyector	350 °C
Temperatura Detector	400 °C
Programa térmico	Desde 90 °C hasta 200 °C a una velocidad de 7 °C/min, seguido de otra rampa desde 200 °C hasta 360 °C a una velocidad de 15 °C/min, manteniendo los 360 °C durante 10 minutos.

Este método modificado nos permite obtener un análisis completo de la muestra en una sola inyección y en un tiempo no superior a 45 minutos, lo que simplifica el proceso y aumenta la velocidad de análisis. Por el contrario, si se sigue la metodología oficial, normas UNE EN ISO 14103 y UNE EN ISO 14105, se necesitan dos columnas distintas y condiciones cromatográficas también diferentes con mayores tiempos de análisis.

La preparación de las muestras para el análisis consiste en pesar unos 100 mg de muestra, introducirlos en un vial al que se añaden las cantidades necesarias de patrones internos y heptano como disolvente. Una vez preparada la muestra se inyectan 0.5 µL para su análisis cromatográfico.

2.2

SÍNTESIS, FUNCIONALIZACIÓN, ACTIVACIÓN Y CARACTERIZACIÓN SUPERFICIAL DE LOS SOPORTES

2.2.1

INTRODUCCIÓN

La heterogeneización de la lipasa seleccionada se lleva a cabo tanto de forma covalente sobre el soporte AlPO_4 /Sepiolita, activado y funcionalizado, según los procedimientos que se describen en los siguientes apartados, como inmovilizada por retención física en sepiolita desmineralizada.

En el caso de la inmovilización covalente, la unión de las enzimas se efectuará mediante una cadena hidrocarbonada enlazada con el soporte inorgánico por enlaces fosfamidicos.

También se ha descrito un procedimiento de inmovilización de enzimas basado en su adsorción física en la estructura porosa tridimensional de las sepiolitas, que han sido sometidas previamente a un tratamiento ácido (patente propiedad de la Universidad de Córdoba [90 - 92, 102]), el cual se utilizará en la inmovilización de las lipasas seleccionadas.

En efecto, las enzimas pueden ser inmovilizadas por adsorción física en materiales naturales de bajo precio, como las arcillas naturales. Las arcillas, al igual que el resto de filosilicatos, presentan una estructura basada en el apilamiento de planos de iones oxígeno e hidroxilos. Los grupos tetraédricos $(\text{SiO})_4^{4-}$ se unen compartiendo tres de sus cuatro oxígenos con otros vecinos formando capas de extensión infinita y fórmula $(\text{Si}_2\text{O}_5)^{2-}$, que constituyen la unidad fundamental de los filosilicatos. En ellas, los tetraedros se distribuyen formando hexágonos y el silicio tetraédrico puede estar, en parte, sustituido por Al^{3+} o Fe^{3+} . Estas capas tetraédricas se unen a otras octaédricas de tipo

gibsitita o brucita y en ellas, algunos Al^{3+} o Mg^{2+} pueden estar sustituidos por Fe^{2+} o Fe^{3+} y más raramente por Li, Cr, Mn, Ni, Cu o Zn. El plano de unión entre ambas capas está formado por los oxígenos de los tetraedros que se encontraban sin compartir con otros tetraedros (oxígenos apicales), y por grupos $(\text{OH})^-$ de la capa brucítica o gibsitica, de forma que, en este plano, quede un $(\text{OH})^-$ en el centro de cada hexágono formado por seis oxígenos apicales. El resto de los grupos $(\text{OH})^-$ son reemplazados por los oxígenos de los tetraedros (**Figura 2.3**).

En algunos filosilicatos (esmectitas, vermiculitas, micas, etc.) las láminas no son eléctricamente neutras debido a las sustituciones de unos cationes por otros de distinta carga. El balance de carga se mantiene por la presencia, en el espacio interlaminar, o espacio existente entre dos láminas consecutivas, de cationes (como por ejemplo en el grupo de las micas), cationes hidratados (como en las vermiculitas y esmectitas) o grupos hidroxilo coordinados octaédricamente, similares a las capas octaédricas, como sucede en las cloritas. La unidad formada por una lámina más la interlámina es la unidad estructural. Los cationes interlaminares más frecuentes son alcalinos (Na y K) o alcalinotérreos (Mg y Ca). Las fuerzas que unen las diferentes unidades estructurales son más débiles que las existentes entre los iones de una misma lámina, por ese motivo los filosilicatos tienen una clara dirección de exfoliación, paralela a las láminas.

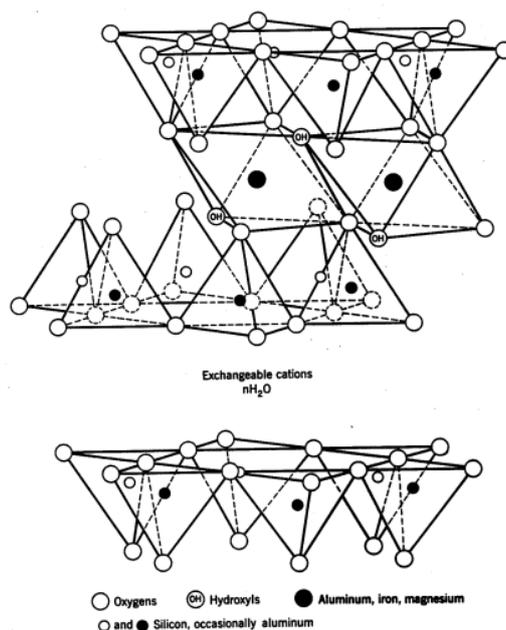


Figura 2.3. Estructura de las arcillas.

A este grupo de minerales pertenecen la sepiolita y la paligorskita, a pesar de presentar diferencias estructurales con el resto de los filosilicatos. Estructuralmente están formadas por láminas discontinuas de tipo mica. Las sepiolitas constituyen un tipo de filosilicato natural que a diferencia del resto, que son laminares, presenta una estructura fibrosa, **Figura 2.4**, ya que la capa basal de oxígenos es continua, pero los oxígenos apicales sufren una inversión periódica cada 8 posiciones octaédricas. Esta inversión da lugar a la interrupción de la capa octaédrica que es discontinua. La fórmula teórica de la celda unidad es $\text{Si}_{12}\text{O}_{30}\text{Mg}_8(\text{OH})_6(\text{H}_2\text{O})_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$, donde el Si^{4+} y el Mg^{2+} pueden ser parcialmente sustituidos por Al^{3+} , Fe^{2+} e iones alcalinos. Cada átomo de Mg completa su coordinación con dos moléculas de agua. Además, en el interior de los canales se alojan cantidades variables de agua zeolítica, que puede eliminarse por vacío o calentamiento a 100 °C.

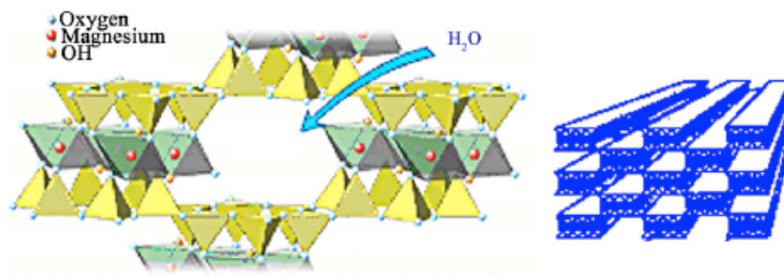


Figura 2.4. Estructura de la sepiolita.

Los canales de $11.5 \times 5.3 \text{ \AA}$, que se desplazan a lo largo de todas las fibras, confieren al sólido una estructura microporosa, responsable de su alta superficie específica [103], similar a la del AlPO-5 [104]. La extracción de los cationes (Mg^{2+} , Al^{3+} , etc.), por tratamiento ácido incrementa de forma apreciable el tamaño de los poros, transformándose en una sílice amorfa [105] o incluso, dependiendo del tratamiento post-extracción del magnesio, puede adquirir una estructura de tipo mesoporoso similar a MCM-41 [106]. Estos poros voluminosos pueden fijar macromoléculas como por ejemplo, enzimas [90].

Las importantes aplicaciones industriales de este grupo de minerales radican en sus propiedades fisico-químicas. Dichas propiedades derivan principalmente de:

- Su extremadamente pequeño tamaño de partícula ($< 2 \text{ nm}$).
- Su morfología laminar (filosilicatos).
- Las sustituciones isomórficas, que dan lugar a la aparición de carga en las láminas y a la presencia de cationes débilmente ligados en el espacio interlaminar.

Como consecuencia de estos factores, estos minerales presentan, por una parte, un valor elevado del área superficial y, a la vez, una gran cantidad de superficie activa, con enlaces no saturados. Por ello pueden interactuar con muy diversas sustancias, en especial compuestos polares, por lo que tienen un comportamiento plástico en mezclas de arcilla-agua con elevada proporción sólido/líquido y son capaces en algunos casos de hincharse, con el

desarrollo de propiedades reológicas en suspensiones acuosas. Por otra parte, la existencia de carga en las láminas se compensa, como ya se ha citado, con la entrada en el espacio interlaminar de cationes débilmente ligados y en un estado variable de hidratación, que pueden ser intercambiados fácilmente mediante la puesta en contacto de la arcilla con una solución saturada en otros cationes. Esta propiedad se conoce como capacidad de intercambio catiónico y es también la base de multitud de aplicaciones industriales. Las sepiolitas y paligorskitas son arcillas con un contenido en dichos minerales superior al 50 %. Son minerales con hábito fibroso con una enorme área superficial debida tanto al pequeño tamaño de partícula como a la porosidad estructural que presenta su estructura. La superficie específica teórica se calcula alrededor de los 900 m²/g, aunque la superficie accesible es muy inferior.

Su peculiar estructura les confiere una serie de propiedades, entre ellas las de formar suspensiones poco afectadas por la concentración iónica y una enorme capacidad de adsorción, siendo poderosos decolorantes y absorbentes. También tienen buenas propiedades reológicas, son capaces de formar geles y suspensiones estables de alta viscosidad a bajas concentraciones de sólido. Al igual que las esmectitas, son susceptibles de ser activadas mediante tratamientos térmicos y ácidos. Los usos a escala industrial de la sepiolita son consecuencia de sus propiedades reológicas, tixotropía, alta superficie específica, baja capacidad de cambio y, sobre todo, su elevado poder absorbente. Por ello se utilizan:

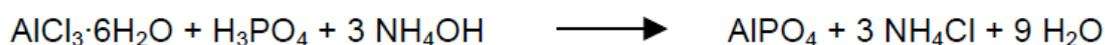
- Como absorbentes, para lechos de animales, suelos, etc.
- Como soporte en aerosoles y aerogeles para pesticidas y fertilizantes.
- Por sus propiedades adsorbentes, en la purificación de productos del petróleo, azúcar, etc.
- En procesos de filtración, floculación y clarificación.
- Por sus propiedades reológicas, en farmacia, pinturas, resinas, y cosmética.
- En cerámica y aislantes.
- En nutrición animal.

2.2.2

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN SUPERFICIAL DEL SISTEMA AlPO_4 /SEPIOLITA UTILIZADO COMO SOPORTE

De acuerdo con la metodología indicada en el Plan de Trabajo, la obtención de un sólido amorfo de elevada superficie específica y acidez controlada es el prerrequisito esencial para poder realizar con garantías la activación del soporte. Es decir, se trata de obtener el AlPO_4 amorfo siguiendo un procedimiento ampliamente utilizado por nuestro equipo [107 - 125], pero introduciendo ciertas modificaciones ya estudiada [90 - 92, 102], que permitan disponer de un elevado número de centros ácidos superficiales, tipo Brönsted.

Se obtienen excelentes resultados llevando a cabo la reacción entre el tricloruro de aluminio hexahidratado y el ácido ortofosfórico, al 85 % en peso, a temperatura constante de 0 °C, y elevando el pH a 6.1, mediante adición de disolución acuosa de hidróxido amónico. Se forma lentamente un del sólido amorfo, según el proceso:



Dicho sólido se ha de lavar con alcohol isopropílico y posteriormente secarse en estufa a 120 °C, durante 24 horas. Este sólido puede proporcionar valores elevados de superficie exterior, así como un elevado número de centros ácidos superficiales si se somete a calcinación en horno mufla durante 3 horas a 350 °C, donde se elimina por sublimación el NH_4Cl formado en la reacción de síntesis (**Figura 2.5.**).

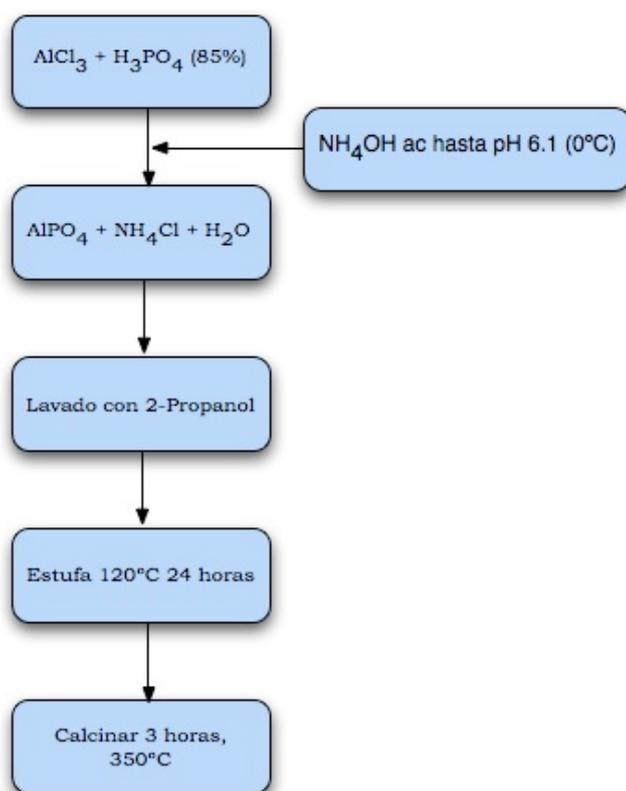


Figura 2.5. Esquema general de síntesis del AlPO_4 amorfo.

La síntesis del soporte AlPO_4 /Sepiolita (20 - 80 % en peso), se lleva a cabo sintetizando el AlPO_4 , según la metodología indicada, en un medio que contiene, junto al tricloruro de aluminio hexahidratado y el ácido fosfórico, la proporción adecuada de sepiolita natural, un silicato de magnesio $\text{Si}_{12}\text{Mg}_8\text{O}_{32}\cdot n\text{H}_2\text{O}$ con composición química nominal de SiO_2 62.0, MgO 23.0, Al_2O_3 1.7, Fe_2O_3 0.5, CaO 0.5, K_2O 0.6 y Na_2O 0.3, suministrada por Tolsa S.A (Vallecas, Madrid). La sepiolita, un silicato magnésico hidratado natural, de naturaleza fibrosa, elevada superficie y bajo precio, se somete así a un proceso de activación superficial, mediante gelificación o precipitación suave en forma de gel del AlPO_4 , en un medio en el que la relación final Sepiolita/ AlPO_4 amorfo sea del orden 80/20.

De esta forma, la sepiolita incorpora una fina capa externa de AlPO_4 que le hace adquirir superficialmente las propiedades físico-químicas de este

compuesto, quedando así activado para su posterior funcionalización. Así, este sólido adquiere valores elevados de superficie externa y un elevado número de centros ácidos superficiales.

La funcionalización de la sepiolita empleada como soporte es posible gracias a la presencia de un elevado número de grupos hidroxilos superficiales, de carácter ácido de Brønsted, valorados con 2,6-dimetilpiridina, a través de los cuales se desarrollarán los enlaces fosfamido que “anclen” las diaminas, que permitan la funcionalización del soporte.

La caracterización estructural del sólido inorgánico empleado como soporte habrá de contemplar como mínimo la obtención del valor de su superficie específica, y en menor medida el resto de sus propiedades texturales: forma, tamaño y distribución de poros. Estos parámetros se obtienen mediante la aplicación de la técnica de adsorción de nitrógeno a la temperatura del nitrógeno líquido.

La caracterización de sus propiedades ácido-básicas superficiales es también un dato fundamental para determinar, en última instancia, si la síntesis ha conseguido los resultados deseados, toda vez que el objetivo perseguido es obtener un elevado número de centros ácidos tipo Brønsted, que constituyen los centros activos adecuados para la formación de los enlaces covalentes con las moléculas orgánicas seleccionadas para ello. La aplicación de un procedimiento espectrofotométrico puesto a punto por nuestro equipo de investigación, nos ha permitido obtener estos parámetros.

2.2.2.1

CARACTERIZACIÓN TEXTURAL MEDIANTE
ADSORCIÓN DE N₂

La aplicación del método B.E.T. a las isothermas de adsorción-desorción a la temperatura del nitrógeno líquido, nos permite la caracterización de las propiedades texturales del sólido amorfo estudiado [90 - 92, 102], pudiéndose obtener valores precisos del área superficial externa, S_{BET} (m²/g), volumen y radio medio de poro, V (ml/g) y d (nm), respectivamente. Los datos de S_{BET} , obtenidos con un sistema automático Micromeritics ASAP 2000, nos indican el tamaño de la superficie externa disponible inicialmente en m²/g de sólido para activar, así como la que queda después del tratamiento de activación. En ambos casos conviene que ésta sea lo más elevada posible, ya que, inicialmente, cuanto mayor sea esta superficie, mayor superficie de AlPO₄ se tendrá tras el tratamiento de activación, y así se podrán introducir mediante el tratamiento posterior de funcionalización, un número mayor de uniones covalentes.

Las técnicas de adsorción de gases se basan en la determinación de la cantidad de gas necesaria para formar una monocapa sobre la superficie a medir. Si esta cantidad se expresa en número de moléculas y se conoce o puede estimarse el área ocupada por cada molécula, puede determinarse el área superficial del sólido. El gas generalmente empleado es el nitrógeno, ya que es el que conduce a resultados más satisfactorios. Otros adsorbatos empleados son argón, algunos hidrocarburos y otros gases inertes.

El fenómeno de adsorción puede ser el resultado de un proceso físico o químico, según la naturaleza del sistema que se considere y la temperatura de trabajo. La adsorción física supone una débil interacción entre sólido y gas, variando la cantidad de gas adsorbido físicamente (a una presión determinada) de modo inverso a la temperatura. Por lo tanto, en la determinación de áreas superficiales, se utilizan bajas temperaturas de trabajo, evitando así la adsorción química del adsorbato.

El estudio de la adsorción de numerosos gases sobre los más variados tipos de sólidos, revela que las isothermas de adsorción, obtenidas al representar el volumen de gas adsorbido (presión del gas) frente a la presión relativa del gas (presión de saturación a la temperatura de trabajo), puede responder a seis tipos diferentes como se observa en la **Figura 2.6**, de acuerdo a la clasificación de Brunauer y Teller [126].

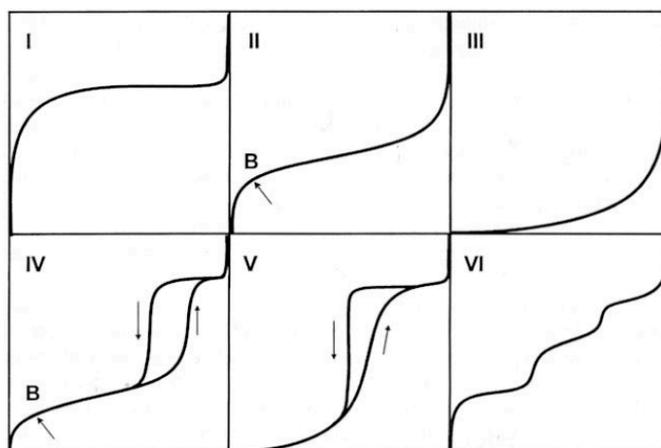


Figura 2.6. Tipos de isothermas según la clasificación BDDT.

A continuación se resumen las características de cada una de las isothermas:

Isoterma del tipo I: se denomina isoterma de Langmuir. Este tipo es característico de sólidos microporosos con una superficie externa muy pequeña. El volumen del gas adsorbido está limitado por la accesibilidad de los microporos.

Isoterma de tipo II: es la forma característica de las isothermas obtenidas para sólidos adsorbentes no porosos o macroporosos, y representa una adsorción en monocapa-multicapa sin restricción. En este tipo de isoterma es posible, en principio, obtener la capacidad de adsorción en monocapa del sólido, dado que puede utilizarse en el cálculo de la superficie específica de éste. El punto B, en el inicio de una porción casi lineal de la isoterma, se asigna a la etapa en la

cual la adsorción en monocapa se completa y comienza la adsorción en multicapa.

Isoterma del tipo III: tiene una forma convexa en todo el intervalo de p/p_0 y no presenta punto B. Este tipo de isoterma es poco frecuente y es característica de sistemas en los que las interacciones adsorbato-adsorbente son muy débiles y por tanto, las interacciones adsorbato-adsorbato han de tenerse en cuenta. Ejemplos de este tipo son la adsorción de nitrógeno sobre polietileno y del vapor de agua sobre grafito.

Isoterma del tipo IV: la principal característica de este tipo de isoterma es que se observa un ciclo de histéresis, que está asociado a la condensación capilar en los mesoporos del sólido. La parte inicial de la isoterma se atribuye a la adsorción en monocapa-multicapa ya que, a bajos valores de p/p_0 la forma de la isoterma es similar al tipo II. Estas isotermas son típicas de adsorbentes y catalizadores industriales.

Isoterma del tipo V: son poco frecuentes y están íntimamente relacionadas con las isotermas del tipo III, diferenciándose en que existe una interacción adsorbato-adsorbente débil. Este tipo de isoterma se obtiene con determinados adsorbentes porosos.

Isoterma del tipo VI: la forma escalonada característica depende del sistema y de la temperatura, representando la adsorción en multicapa sobre una superficie uniforme no porosa. La altura de cada etapa representa la capacidad de monocapa para cada capa adsorbida y, en el caso más sencillo permanece constante para dos o tres capas adsorbidas. Las isotermas del tipo VI se obtienen con argón o criptón sobre grafito a la temperatura del nitrógeno líquido.

La interpretación teórica de los tipos I a V se da por Brunauer, Emmett y Teller [126] que desarrollan una teoría unificada de la adsorción física, lo que supone un gran avance en la determinación de las áreas superficiales de los sólidos porosos.

2.2.2.2

CARACTERIZACIÓN ÁCIDO-BASE SUPERFICIAL MEDIANTE ESPECTROFOTOMETRÍA

El método empleado para la determinación de las características ácido-básicas de los soportes, puesto a punto en nuestros laboratorios anteriormente [127-131], está basado en determinar la variación en la concentración del agente valorante, en una disolución de ciclohexano, al entrar en contacto con un sólido durante 1 hora, en agitación constante y a temperatura ambiente (25 °C). Las concentraciones de la disolución ciclohexánica se determinan por espectrofotometría, en intervalos de concentración adecuados y que cumplan la Ley de Lambert-Beer.

La cantidad de agente valorante, obtenida a partir de las diferencias en las concentraciones iniciales y finales, está relacionada con el peso de catalizador y con las concentraciones de equilibrio, ajustándose a una isoterma de tipo Langmuir, que nos permite obtener la cantidad de agente valorante adsorbido en monocapa, por gramo de sólido. Este parámetro constituye una medida del número de centros activos de pK_a menores o iguales a los del agente valorante.

Este proceso de retención tipo Langmuir, a partir de un valor dado de la relación C/C_0 se ajusta a la siguiente expresión:

$$C/X = 1 / X_m + C / X_m$$

siendo: C, la concentración de valorante en disolución, en equilibrio con el adsorbido por el sólido.

X, la cantidad de valorante adsorbido por gramo de sólido.

b, la constante de Langmuir.

X_m , la cantidad de valorante adsorbida en monocapa por gramo de sólido.

Representando gráficamente C/X frente a C , se obtiene una recta para valores iguales o menores a un valor de C/C_0 . En esta región se produce la adsorción de agente valorante en monocapa, pudiéndose calcular X_m , que es una medida de la acidez o basicidad. Puede también obtenerse el valor de la constante b , que está relacionada con la interacción agente valorante-centro activo y que permite obtener el valor de la constante de equilibrio, K , de dicha interacción:

$$K = b \cdot X_m$$

No obstante, aunque tenga interés calcular los valores de K , el elevado error experimental que presenta su cálculo, determina que sólo pueda ser empleado de forma cualitativa y con las adecuadas precauciones. Es por ello que para evaluar la distribución de la fortaleza ácida o básica de los centros, sea preferible emplear agentes valorantes con diferentes valores de pK_a .

Dado que nuestro interés se centra, fundamentalmente, en evaluar el número de centros ácidos tipo Brønsted, emplearemos como agente valorante específico la 2,6-dimetilpiridina ($pK_a = 7.0$), y también usaremos la piridina, ya que su valor de pK_a (5.3) corresponde a la acidez total, (a un valor de pK_a parecido) que supone la suma de centros ácidos Brønsted y Lewis. A fin de obtener una visión general del sólido, desde un punto de vista de sus propiedades ácido básicas, también se llevarán a cabo las valoraciones con ácido benzoico ($pK_a = 4.2$) de los centros básicos de fortaleza media,

Figura 2.7.

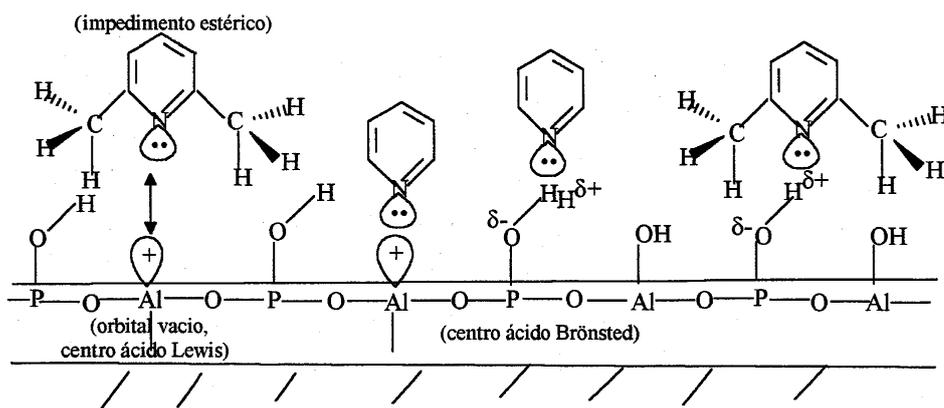


Figura 2.7. Discriminación entre centros ácidos Brønsted y Lewis como consecuencia del impedimento estérico que presenta la 2,6-dimetilpiridina ($pK_a = 7$) respecto a la piridina ($pK_a = 5.3$).

La determinación de la acidez superficial con piridina y dimetilpiridina se plantea por tanto como un método para discriminar la acidez tipo Brønsted, asociada a los grupos -OH, que son los que nos interesan, frente a la acidez total, suma de centros Brønsted y Lewis determinados con piridina.

2.2.2.3

ACTIVACIÓN Y FUNCIONALIZACIÓN DEL SOPORTE AIPO₄/SEPIOLITA CON 4-AMINOBENCILAMINA Y TEREFTALDIALDEHÍDO

La funcionalización del sistema AIPO₄/Sepiolita, utilizado como soporte inorgánico para la inmovilización covalente de enzimas [90 - 92, 102], se ha llevado a cabo exclusivamente con dos moléculas, p-hidroxibenzaldehído y 4-amino-bencilamina. La reacción de los grupos hidroxilo del fenol y amino, respectivamente se conduce muy eficazmente operando en "fase seca" y mediante irradiación en horno microondas. Es decir, en ausencia de

disolvente, y sometiendo el sólido activado, en el que se ha impregnado el p-hidroxibenzaldehído o la 4-amino-bencilamina, a irradiación en microondas durante breves minutos.

Para la inmovilización covalente de la lipasa, usando como soporte AlPO_4 /Sepiolita (20 - 80% en peso), previamente activados con 4-aminobencilamina y aldehído tereftálico, de acuerdo con la síntesis en fase sólida por pasos recogida en la **Figura 2.8**, [90-92,102], la activación del soporte se realizará mediante la consecución de un “linker” con la funcionalización adecuada para que la enzima pueda unirse al soporte con un enlace covalente. Para ello se harán reaccionar los grupos hidroxilos superficiales de carácter ácido del soporte con una diamina, la 4-aminobencilamina, y posteriormente con un dialdehído aromático, el tereftaldialdehído, que aportará un grupo carbonilo terminal, con el que los grupos amino libres de la enzima formarán el enlace imínico. El proceso de activación se lleva a cabo, por tanto, en dos etapas, pudiéndose efectuar en el mismo matraz de reacción, tras el lavado conveniente del sólido, tras cada reacción. Además, ambas reacciones se efectúan de forma rápida y limpia, en un horno microondas convencional.

La reacción de los grupos ácidos superficiales del soporte, con uno de los grupos amino terminales de la aminobencilamina, se lleva a cabo mediante la homogeneización en un matraz de 100 ml, de 20 g del soporte AlPO_4 /Sepiolita, 80 ml de éter etílico y 4 ml de aminobencilamina (Merck, 99 %), durante una hora en rotavapor a temperatura ambiente. Estas cantidades proporcionan las condiciones denominadas de “humedad incipiente” que permiten la homogeneización de la mezcla empleando la mínima cantidad de disolvente. A continuación se elimina el éter etílico, por calentamiento en baño de agua en el mismo rotavapor pero sin efectuar vacío, ya que hierve a 33 °C. A continuación se introduce el matraz en un horno microondas doméstico donde se le somete, durante quince minutos (en periodos de 2 minutos), a irradiación a 380 W. Tras varios lavados con éter etílico del sólido funcionalizado, para eliminar el reactivo que no ha reaccionado con el sólido, éste se vuelve a impregnar en rotavapor con aldehído tereftálico, 4 g, que tras eliminar en rotavapor el éter etílico, se

somete a una nueva activación en microondas, irradiando a 380 W durante cinco minutos. La alta conjugación de la molécula enlazada al soporte inorgánico, tras la formación del enlace imínico, proporciona un color amarillo intenso al sólido activado. Eliminado el aldehído tereftálico que no ha reaccionado por lavado con éter etílico, el soporte activado está listo para ser empleado en la inmovilización de las lipasas.

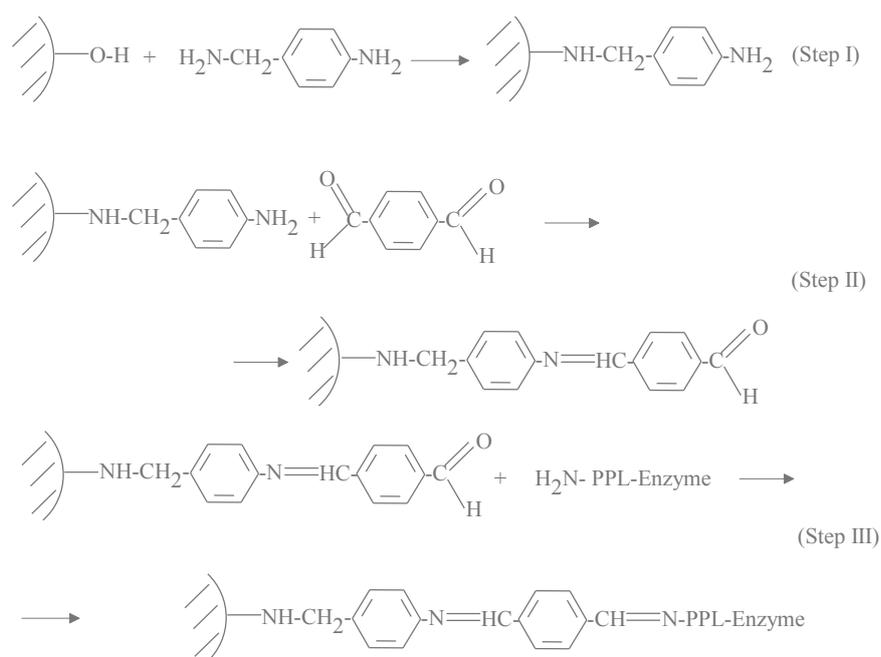


Figura 2.8. Esquema general para la inmovilización de la enzima (en este caso la PPL) a través de los grupos ε-amino de los residuos de lisina. La activación del AlPO₄ amorfo soportado por microondas calentado con 4-aminobenzilamina (paso 1), y activación post-sintética con tereftaldicarboxaldehído (paso 2) antes de la inmovilización covalente de la enzima a través de los residuos de lisina (paso 3).

2.2.2.4

ACTIVACIÓN Y FUNCIONALIZACIÓN DEL SOPORTE ALPO₄/SEPIOLITA SOLO POR REACCIÓN CON p-HIDROXIBENZALDEHÍDO

Siguiendo la síntesis en fase sólida por pasos recogida en la **Figura 2.9** y de acuerdo con la metodología publicada y patentada [90 - 92, 102], la funcionalización del soporte tiene lugar a través de la reacción entre 20 g de soporte y 2 g de p-hidroxibenzaldehído en un horno microondas convencional (15 minutos, a 380 W, en periodos de 2 minutos).

La activación del soporte se realiza mediante la consecución de un “linker” con la funcionalización adecuada para que la enzima pueda unirse al soporte mediante un enlace covalente. Para ello se harán reaccionar los grupos hidroxilos superficiales de carácter ácido del soporte con un aldehído, el p-hidroxibenzaldehído, que aportará un grupo carbonilo terminal, con el que los grupos amino libres de la enzima formarán el enlace imínico.

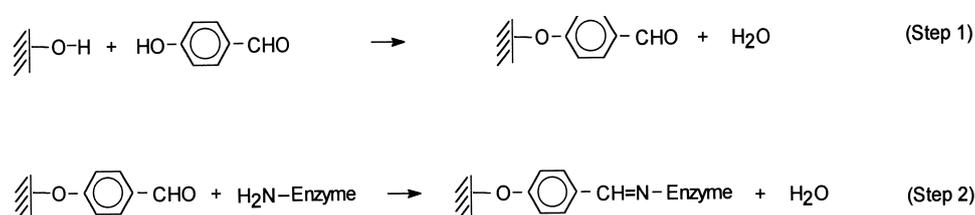


Figura 2.9. Esquema general para la inmovilización de la enzima a través de los grupos ε-amino de los residuos de lisina. La activación del AlPO₄ amorfo se lleva a cabo por microondas, calentado con p-hidroxibenzaldehído (paso 1) antes de la inmovilización covalente de la enzima a través de los residuos de lisina (paso 2).

2.2.2.5

SOPORTE SEPIOLITA DESMINERALIZADA

A fin de evaluar el efecto del tratamiento de desmineralización se realizan una serie de ensayos en los que se emplea la sepiolita de Tolsa S.A, Vallecas (Madrid), sin ningún tratamiento especial, en forma pura. Estos resultados se han comparado con los obtenidos cuando esta misma sepiolita es sometida a un tratamiento ácido desmineralizante, como soporte de la lipasa [22, 23, 90, 102], frente a la producción de biodiesel mediante la transesterificación de aceite de girasol con etanol absoluto.

El tratamiento ácido desmineralizante se lleva a cabo a temperatura ambiente y con agitación magnética en un vaso de precipitado con 400 cm³ de una disolución 1 M de HCl y 40 g de sepiolita. Cada 8 horas, se determina la presencia de Mg en el sobrenadante empleando “amarillo titán” como indicador específico. El lavado ácido se repite hasta que se determina la ausencia de Mg. Para mantener la estructura fibrosa así obtenida, el sólido resultante se mantiene en todo momento en condiciones de humedad incipiente. Para la inmovilización de la enzima se sigue la metodología descrita [101], poniendo en contacto en el matraz de reacción 1.7 g de sepiolita desmineralizada, 0.04 g de lipasa y 6 ml de etanol absoluto. Antes de efectuar la reacción se mantiene a 4 °C con agitación ocasional, durante 24 horas.

Para llevar a cabo la inmovilización de la enzima sobre la sepiolita natural sin desmineralizar se sigue la metodología descrita [22, 23, 90], poniendo en contacto en el matraz de reacción 5 g de esta sepiolita sin desmineralizar, 0.2 g de lipasa, 5 ml de etanol absoluto y 5 ml de agua destilada. Antes de efectuar la reacción se mantiene con agitación controlada en rotavapor (1 hora, 25 °C).

2.3

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CATALÍTICA DE LOS SISTEMAS ENZIMÁTICOS

Para la obtención del biodiesel mediante el uso de lipasas se ha utilizado una enzima comercial de grado alimentario y de bajo coste (Biolipasa R) suministrada por Biocon®, que ha sido inmovilizada por el procedimiento anteriormente descrito, ya que de las enzimas estudiadas, además de ser la que ha presentado uno de los mejores comportamientos en forma libre, es la enzima de menor coste de todas las estudiadas. El aceite de girasol empleado como sustrato es un aceite comercial para uso alimentario. La reacción de transesterificación se ha llevado a cabo con etanol absoluto (Panreac, calidad p. a., y riqueza 99.98 %).

Para la inmovilización covalente de la lipasa se ha utilizado como soporte AlPO_4 /Sepiolita (20 - 80 % en peso), previamente activado con 4-aminobencilamina y aldehído tereftálico y con p-hidroxibenzaldehído, de acuerdo con la síntesis en fase sólida por pasos recogida en las **Figuras 2.8** y **2.9**, según la metodología expuesta anteriormente. También se ha llevado a cabo su inmovilización mediante retención física en sepiolita desmineralizada.

La activación del soporte (AlPO_4 /Sepiolita) se lleva a cabo mediante la consecución de un “linker”, una cadena orgánica unida covalentemente al soporte que termina en un grupo funcional capaz de reaccionar con algún grupo activo presente en las cadenas proteicas de las enzimas, quedando así las enzimas unidas al soporte con enlaces covalentes. Ésto se consigue en el presente caso mediante la reacción del soporte con p-hidroxibenzaldehído, o con dos reacciones consecutivas, realizadas en fase sólida, en la primera se hacen reaccionar los grupos hidroxilos superficiales de carácter ácido Brönsted del soporte con una diamina, la 4-aminobencilamina, y posteriormente con un dialdehído aromático, el tereftaldialdehído, que aporta un grupo carbonilo terminal, con el que los grupos ϵ -amino de las lisinas de las enzimas forman enlaces imínicos.

La inmovilización de la Biolipasa R se lleva a cabo a temperatura ambiente, y a dos valores diferentes de pH (7 y 9), al poner en contacto la cantidad necesaria del sólido inorgánico previamente activado y funcionalizado (0.5 g) con la cantidad necesaria de la enzima elegida (0.04 g) en el matraz de reacción (50 ml) con 6 ml de etanol absoluto. Se agita y guarda en frío (4 °C, 24 horas), con agitación ocasional cada tres o cuatro horas, a fin de que se lleve a cabo la interacción covalente de los restos de lisina de la lipasa con los grupos activos (carbonilos aldehídicos). Finalmente, con ayuda de otros 6 mL de etanol adicionados, el sólido que contiene la enzima inmovilizada es separado por centrifugación, y el filtrado resultante es separado también para determinar la cantidad de lipasa que permanece en la disolución sobrenadante. La actividad catalítica de esta disolución es proporcional a la cantidad de enzima disuelta en la misma, por lo que se puede determinar así la cantidad de lipasa que no ha sido covalentemente inmovilizada. La comparación de este valor con la actividad de la enzima inmovilizada y libre permite determinar la cantidad de enzima inmovilizada, y su eficiencia.

La cantidad de enzima retenida por inmovilización, se puede saber calculando el porcentaje de enzima inmovilizada, E_{imm} , que se calcula mediante la diferencia entre la actividad catalítica de la enzima nativa y la actividad del sobrenadante separado por centrifugación en cada uno de los procesos de inmovilización:

$$E_{imm} = \frac{r_{nat} - r_{fil}}{r_{nat}} \times 100$$

La actividad residual después de la inmovilización, obtenida del porcentaje de enzima inmovilizada catalíticamente activa, E_{res} , se determina de la relación entre las actividades de la enzima inmovilizada y nativa:

$$E_{res} = \frac{r_{imm}}{r_{nat}} \times 100$$

La actividad específica, E_{spe} , es indicativa de la eficiencia de la enzima inmovilizada con respecto a la enzima nativa, y se puede obtener de la siguiente relación:

$$E_{spe} = \frac{E_{res}}{E_{imm}} \times 100 = \frac{r_{imm}}{r_{nat} - r_{fil}} \times 100$$

2.3.1

SISTEMA FUNCIONALIZADO CON p-HIDROXIBENZALDEHÍDO

Para efectuar las reacciones de transesterificación con este sistema se emplea la misma Biolipasa R de Biocon® y aceite de girasol comercial de uso alimentario. Todas las reacciones de síntesis de biodiesel se realizan con etanol (Panreac , calidad p. a., y riqueza 99.98 %).

En este caso, se emplea como soporte para efectuar la inmovilización covalente de la lipasa, Sepiolita/AlPO₄ funcionalizado con p-hidroxibenzaldehído.

La eficiencia del proceso de inmovilización se confirma mediante Espectroscopia Ultravioleta Visible con Reflectancia Difusa (UV-vis-RD), llevada a cabo en un espectrofotómetro de UV-RD Varian Carey 1E.

A partir de los correspondientes espectros obtenidos en cada una de las diferentes etapas se podrán evidenciar los cambios producidos en la superficie del sólido inorgánico empleado como soporte en los sucesivos tratamientos que conducen a su funcionalización con grupos aldehídos superficiales, capaces de reaccionar (e inmovilizar) las moléculas de enzima.

La inmovilización de la lipasa tiene lugar mediante el procedimiento descrito previamente en el apartado anterior. De la misma forma, se sigue la metodología anteriormente descrita para evaluar la cantidad de enzima fijada

2.3.2

SISTEMA FUNCIONALIZADO CON 4-AMINO BENCILAMINA Y TEREFALDIALDEHÍDO

Para efectuar las reacciones de transesterificación con este sistema se emplea la misma Biolipasa R de Biocon® y aceite de girasol comercial de uso alimentario. Todas las reacciones de síntesis de biodiesel se realizan con etanol (Panreac , calidad p. a., y riqueza 99.98 %).

En este caso, se emplea como soporte para efectuar la inmovilización covalente de la lipasa Sepiolita/ AlPO_4 funcionalizado con 4-aminobencilamina y aldehído tereftálico, de acuerdo con la síntesis en fase sólida recogida en la **Figura 2.9**, según la metodología anteriormente descrita.

La eficiencia del proceso de inmovilización se confirma mediante la técnica de Espectroscopia de Ultravioleta Visible con Reflectancia Difusa (UV-vis-RD), llevada a cabo en un espectrofotómetro de UV-RD Varian Carey 1E, realizando barridos correspondientes a longitudes de onda entre 200 y 900 nm. A partir de los correspondientes espectros obtenidos en cada una de las diferentes etapas, se pueden evidenciar los cambios producidos en la superficie del sólido inorgánico empleado como soporte, en los sucesivos tratamientos que conducen a su funcionalización con grupos aldehídos superficiales, capaces de reaccionar (e inmovilizar) con aminoácidos de las enzimas.

La inmovilización de la lipasa tiene lugar a temperatura ambiente, al poner en contacto la cantidad del sólido inorgánico previamente

funcionalizado (0.5 g) con la cantidad de lipasa elegida (0.04 g), en el matraz de reacción (50 ml), con 6 ml de etanol. Se agita y guarda en frío (4 °C, 24 horas), con agitación ocasional cada tres o cuatro horas, a fin de que se lleve a cabo la interacción covalente de los restos de lisina de la enzima con los grupos activos (carbonilos aldehídicos). Finalmente, con ayuda de otros 6 ml de etanol adicionados, el sólido que contiene la enzima inmovilizada es separado por centrifugación, y el filtrado resultante es separado también para determinar la cantidad de lipasa que permanece en la disolución sobrenadante. La actividad catalítica de esta disolución es proporcional a la cantidad de enzima disuelta en la misma, por lo que se puede determinar así la cantidad de lipasa que no ha sido covalentemente inmovilizada. La comparación de este valor con la actividad de la enzima inmovilizada y libre permite determinar la cantidad de enzima inmovilizada, y la eficiencia de la misma.

2.3.3

SISTEMA SEPIOLITA DESMINERALIZADA

Para efectuar las reacciones de transesterificación con estos sistemas se emplea igualmente la misma Biolipasa R comercial y el mismo aceite de girasol comercial para uso alimentario, empleado como sustrato. La reacción de transesterificación se ha llevado a cabo con etanol absoluto (Panreac, calidad p. a., y riqueza 99.98 %).

A fin de evaluar el efecto del tratamiento de desmineralización se realizan una serie de ensayos en los que se emplea la sepiolita de Tolsa S.A, Vallecas (Madrid), sin ningún tratamiento especial, en forma pura. Estos resultados se han comparado con los obtenidos cuando esta misma sepiolita es sometida a un tratamiento ácido desmineralizante, como soporte de la lipasa [22, 23, 90, 102], frente a la producción de biodiesel mediante la transesterificación de aceite de girasol con etanol absoluto.

Para la inmovilización de la enzima se sigue la metodología descrita [101], poniendo en contacto en el matraz de reacción 1.7 g de sepiolita desmineralizada, 0.04 g de lipasa y 6 ml de etanol. Antes de efectuar las reacciones, se mantiene el matraz a 4 °C con agitación ocasional, durante 24 horas.

Para llevar a cabo la inmovilización de la enzima sobre la sepiolita natural sin desmineralizar se sigue la metodología descrita [22, 23, 90], poniendo en contacto en el matraz de reacción 5 g de esta sepiolita sin desmineralizar, 0.2 g de lipasa, 5 ml de etanol absoluto y 5 ml de agua destilada. Antes de efectuar la reacción se mantiene con agitación controlada en rotavapor (1 hora, 25 °C).

El sólido que contiene la enzima inmovilizada es separado por centrifugación, y el filtrado resultante es separado también para determinar la cantidad de lipasa que permanece en la disolución sobrenadante. La actividad catalítica de esta disolución es proporcional a la cantidad de enzima disuelta en la misma, por lo que se puede determinar así la cantidad de lipasa que no ha sido inmovilizada. La comparación de este valor con la actividad de la enzima inmovilizada y libre permite determinar la cantidad de enzima inmovilizada, y la eficiencia del proceso.

2.3.4

LIPASAS INMOVILIZADAS COMERCIALES

Con la finalidad de comparar el comportamiento de las enzimas inmovilizadas comerciales con la enzima inmovilizada en el presente trabajo se han estudiado dos lipasas inmovilizadas de la marca Novozymes®, Lipozyme RM IM y Novozyme 435, ambas ampliamente utilizadas en la industria e investigación. Se pretende explorar la capacidad de estas enzimas comerciales para la producción de biocombustible, así como llevar a cabo una comparativa

entre el rendimiento de enzimas inmovilizadas comerciales y la enzima seleccionada en la presente memoria para ser inmovilizada.

Se han llevado a cabo reacciones de transesterificación con aceite de girasol y etanol absoluto, en diferentes condiciones de pH, temperatura, contenido en agua y cantidad de enzima, a fin de evaluar el comportamiento de esta enzima en el proceso de producción de biocombustible. Todas las reacciones se han realizado siguiendo la metodología anteriormente descrita para otras lipasas. En todas las reacciones para esta enzima se ha utilizado una relación volumétrica aceite/etanol 12/3.5, ya que ha demostrado ser apropiada para todas las enzimas estudiadas en el presente trabajo.

2.4

DISEÑO EXPERIMENTAL ESTADÍSTICO PARA EVALUAR LAS VARIABLES DE REACCIÓN

Para estudiar las variables que influyen en el proceso biocatalizado se han seguido dos metodologías diferentes:

1) Los ensayos OVAT (One Variable At Time) en los que se estudia una variable dentro de un intervalo de trabajo, mientras las demás permanecen constantes. Desafortunadamente, este método no permite determinar, con la máxima certeza, las variables que más influyen en el proceso, ya que nos limitamos a investigar únicamente una parte del intervalo de definición de la variable. Por consiguiente, no se observa la influencia conjunta de las diferentes variables objeto de estudio.

2) El análisis factorial es un método de variación múltiple en el cual, todos los parámetros cambian simultáneamente de manera programada. De este modo se desarrolla un estudio eficiente y racional de las variables elegidas en todo su intervalo, que permite obtener una información adicional de los efectos

debidos al conjunto de dos o más variables [134]. Este tipo de diseño experimental se está usando ampliamente en la actualidad para analizar la influencia de los parámetros de reacción en todo tipo de reacciones, y concretamente en la producción enzimática de biodiesel [135 - 140]. En la presente Memoria se ha utilizado esta metodología para analizar el efecto de las variables más influyentes en el proceso de transesterificación enzimática llevado a cabo por varias enzimas, mediante el uso del análisis ANOVA. Inicialmente se aplicó la metodología OVAT para la primera enzima estudiada (PPL) [141], y se pudo comprobar que había variables que podían tener un efecto conjunto y se optó por seguir la metodología de análisis factorial al estudio de las restantes enzimas.

El diseño experimental se ha realizado con el software Statgraphics® en su versión 5.1. Las respuestas (factores) elegidas para el análisis han sido conversión, contenido en FAEE y viscosidad cinemática, los dos primeros determinados por cromatografía gaseosa y la última siguiendo la metodología anteriormente citada. La respuesta, o variable dependiente, se puede expresar como una función polinómica de las variables de estudio (factores):

$$y = b_0 + \sum b_i x_i + \sum b_{ij} x_i x_j$$

En el estudio de la lipasa pancreática de cerdo (PPL) se han fijado intervalos de estudio para las siguientes variables: temperatura, relación aceite/etanol, pH (diferentes cantidades de disolución de NaOH de diferentes concentraciones), cantidad de agua añadida al medio de reacción, velocidad de agitación, tiempo de reacción y cantidad de enzima empleada en la reacción. Es decir, se han fijado todas las variables de reacción excepto una que se ha modificado en un intervalo predefinido.

Tras el análisis de los datos obtenidos se observó que algunas variables influían de forma conjunta, por lo que se optó por seguir la metodología de análisis multivariable para el estudio de las restantes enzimas.

III RESULTADOS: LIPASAS EN FORMA LIBRE

3.

RESULTADOS

En éste capítulo se exponen, de forma ordenada, los resultados de los experimentos llevados a cabo con cada una de las lipasas estudiadas en forma libre. También se exponen los resultados obtenidos en los diseños experimentales realizados para optimizar las condiciones de reacción de cada una de estas lipasa. Así, se ha estudiado la influencia de las diferentes variables (temperatura, concentración, cantidad de agua presente, etc.) que afectan la reacción de transesterificación, atendiendo a varios parámetros de interés, como pueden ser: la conversión, contenido en FAEE, mono y diglicéridos y la viscosidad cinemática, siendo este último un parámetro clave para la medida de la utilidad de estos biocombustibles para su uso en motores diesel.

3.1

LIPASA PANCREÁTICA DE CERDO (PPL)

La PPL es una lipasa extracelular ampliamente estudiada y muy utilizada en la industria farmacéutica para la resolución de mezclas de enantiómeros quirales, bien mediante hidrólisis enantioselectivas [142 - 146] o mediante procesos de transesterificación o alcoholólisis [147]. Esta amplia utilización de las lipasas en Química Fina se debe al relativo bajo costo de estas enzimas y a su accesibilidad comercial, ya que existen diversas empresas a nivel internacional capaces de proporcionar estos biocatalizadores. Además, estas enzimas presentan alta estabilidad y no requieren el uso de cofactores.

A pesar de los intentos realizados de aplicar la capacidad de estas enzimas en las reacciones de transesterificación para la producción de

biodiesel, las conversiones de los triglicéridos a FAME obtenidas, han sido, en la mayoría de las ocasiones, de 60 - 70 % como máximo [148 - 152]. En este sentido, se ha descrito recientemente [153] la obtención de rendimientos superiores, 75 - 95 %, cuando se emplean alcoholes diferentes al metanol (e.g. etanol, propanol o butanol) en la reacción de transesterificación del aceite de Babasú con PPL inmovilizada. Estas limitaciones en los niveles de conversión, que restringen seriamente la producción de biodiesel, se han asociado al carácter 1,3-regioselectivo de muchas lipasas que dificulta realizar la alcoholólisis de los ésteres de ácidos grasos en la posición 2 del glicerol [29]. Así, las posiciones 1 y 3 de los triglicéridos son atacadas con mucha mayor facilidad, que la posición 2, lo que deberá ser tenido en cuenta para su aplicación a la producción de biodiesel [30, 154]. Por esta razón, se obtienen tiempos de reacción muy largos, al compararse con la catálisis alcalina [155, 156], ya que las conversiones superiores al 66 % se logran, en la mayoría de los casos, debido a un proceso paralelo, ya descrito, de 1,2-acilmigración que se produce en los glicéridos [31]. En la práctica, los resultados descritos que permiten conversiones elevadas en catálisis enzimática son debidos a la participación de estos procesos de 1,2-acilmigración en los monoglicéridos inicialmente obtenidos [157, 158].

En cualquier caso, como los tiempos de conversión son significativamente superiores a los obtenidos con la catálisis alcalina, aún no se aplican a escala comercial los métodos enzimáticos para la producción de biodiesel convencional, es decir, el regulado actualmente por la norma europea EN 14214. Este biodiesel, obtenido por transesterificación metanólica de aceites y grasas, básicamente consigue de una forma sencilla reducir la viscosidad de esta materia prima en unos ordenes de magnitud de 10 á 20 veces, dejándolos en unos valores próximos al diesel, estimada entre 2 y 5.5 cSt. Este parámetro es esencial para permitir la sustitución del petrodiesel por biocombustibles, ya que el resto de los parámetros descritos en la norma EN 14214 son esencialmente similares [159 - 161]. Los monoglicéridos presentan valores de viscosidad en el rango de los FAME, siendo los diglicéridos y triglicéridos los responsables de los elevados valores de viscosidad de los aceites y grasas. Sin embargo, un producto, constituido por la mezcla obtenida en la alcoholólisis enzimática 2 FAEE/MG, con valores

de viscosidad similar a las mezclas habituales de FAEE o FAME, podría ser considerado perfectamente, desde el punto de vista técnico, como un biocombustible. Además, este biocombustible integra la glicerina, lo que evita la generación de subproductos y aumenta el rendimiento del proceso. De hecho, hay en la actualidad diversas líneas que tratan de conseguir la integración de la glicerina en el biocombustible ya que los mercados, con la actual producción de biodiesel convencional, no son capaces de adsorber las ingentes cantidades de glicerina generadas [4, 145, 162 - 165]. Además, recientes investigaciones han demostrado que los componentes minoritarios del biodiesel EN 14214, como son los monoglicéridos, incorporan un importante aumento del poder lubricante [166 - 170].

En este estudio, entre otras lipasas, se ha utilizado la PPL en la reacción de transesterificación de aceite de girasol con etanol, en un medio libre de disolvente, como alternativa más "verde" que el metanol, de acuerdo a los resultados previamente obtenidos por nuestro grupo [1, 22, 23, 90, 102, 141]. El carácter 1,3-selectivo y el relativo bajo costo de la enzima, permiten albergar esperanzas respecto a su potencial como biocatalizador en la producción de biocombustibles.

Para ello se ha estudiado la influencia de los siguientes parámetros: la temperatura, las proporciones relativas aceite/etanol, el porcentaje de enzima utilizada como biocatalizador, el pH y la cantidad de agua presente en el medio de reacción. Este último parámetro tiene una enorme importancia en este tipo de reacciones y aún más en medios de reacción libres de disolvente, como es el caso del estudio abordado.

3.1.1

EFFECTO DE LAS VARIABLES EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

El estudio de las variables de reacción en la actividad enzimática de la PPL ha seguido la metodología O.V.A.T (*One Variable At Time*), por la que se han fijado unas condiciones iniciales y se han ido modificando las variables de estudio de una en una. Este método no aporta información sobre el efecto conjunto de varios parámetros de reacción, pero sí sobre la influencia de las variables aisladas.

Debido a que nuestro grupo poseía información previa sobre esta enzima [22, 23, 90, 141 - 143] y de cuáles eran las variables más importantes en su utilización, se decidió usar esta metodología experimental con la finalidad de evaluar con más detalle la influencia de aquéllas en los intervalos de estudio seleccionados para cada una de ellas.

3.1.1.1

INFLUENCIA DE LA RELACIÓN ACEITE/ETANOL EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA PPL

El estudio de la influencia de este parámetro de reacción se ha investigado utilizando diferentes relaciones volumétricas de aceite/etanol, un medio de reacción libre de disolvente y empleando una sola etapa de adición de etanol.

Inicialmente se fijaron las condiciones de reacción (12 ml aceite, 0.01 g PPL, 50 °C, pH 12, 500 r.p.m. y 30 minutos de reacción), de acuerdo con los datos de ensayos previos [22, 23, 141] que indicaban que estos valores eran

apropiados para obtener unos buenos rendimientos. La **Tabla 3.1** muestra los resultados de las reacciones llevadas a cabo con este propósito.

Tabla 3.1. Rendimiento, conversión, viscosidad y velocidad (TOF), para las reacciones de transesterificación utilizando diferentes proporciones aceite/etanol y PPL en forma libre como catalizador.^a

Aceite/Alcohol (ml/ml) (mol/mol)	Viscosidad Cinemática 40 °C (cSt)	FAEE (%)	MG+DG (%)	TG (%)	Conv. (%)	TOF (g_{FAEE} / h g PPL)	
(12/6)	1/10.3	6.2	69.2	14.6	16.2	82.6	629.7
(12/3)	1/5.1	11.8	51.8	31.2	17	62.4	471.4
(12/2)	1/3.3	14.8	32.9	26.5	40.6	55.4	299.4
(12/1.5)	1 / 2.6	18.8	25.9	20.8	53.3	55.6	235.7

^a Condiciones de reacción: 12 ml (0.01 mol) aceite de girasol, 0.01 g PPL, 50°C, 30 minutos de reacción, pH 12 (alcanzado a través de la adición de 0.1 ml de NaOH 10 N) y 500 r.p.m.

Como puede apreciarse en la **Tabla 3.1**, la conversión decrece conforme aumenta la relación aceite/etanol, desde 1/10.3 a 1/2.6 mol/mol, comportamiento que ha sido descrito por otros autores [171, 172], y también disminuye la capacidad de procesamiento de la PPL expresado como TOF. Este descenso se ve acompañado de un incremento, tanto de las cantidades de MG+DG presentes, como de la viscosidad de las mezclas de reacción obtenidas.

En las condiciones de reacción seleccionadas (aceite/etanol 2/1 v/v, 50 °C, 0.01 g PPL y 30 min de reacción) se obtuvo sobre un 83 % de conversión, un 16 % de triglicéridos no convertidos, así como un 15 % de MG+DG (aproximadamente un 2 % DG y un 13 % de MG). También se obtuvieron buenos valores de viscosidad cinemática (6.2 cSt), lo cual implica que el biodiesel así obtenido puede ser potencialmente empleado de forma directa en motores diesel sin necesidad de mezclarlo con diesel convencional [1, 173, 174]. Este comportamiento podría ser atribuido al incremento de la eficiencia difusional asociada al aumento de las cantidades de etanol, además de la influencia de éste parámetro en la estequiometría.

3.1.1.2

INFLUENCIA DEL TIEMPO DE REACCIÓN EN LA
ACTIVIDAD DE LA PPL

En los estudios anteriores realizados por nuestro grupo [22, 23, 90, 141], se emplearon tiempos de reacción muy variables, pero los resultados obtenidos inducían a pensar que la mayor parte de la conversión se llevaba a cabo en tiempos realmente muy cortos, por lo cual se ha considerado la necesidad de evaluar con más exactitud este comportamiento. La **Tabla 3.2** muestra los datos obtenidos al realizar la reacción de transesterificación en las condiciones indicadas y llevando a cabo un seguimiento durante una hora de reacción. Los datos indican que, en efecto, en menos de una hora puede alcanzarse una conversión cuantitativa operando bajo las condiciones de reacción estudiadas.

Es interesante destacar el hecho de que se alcanza la máxima cantidad teórica posible de FAEE (~66 % teniendo en cuenta el carácter 1,3-selectivo de la PPL) a tiempos muy cortos de reacción, sobre 3-5 minutos [23]. El 15 % adicional de rendimiento en FAEE, obtenido a tiempos más largos, puede ser atribuido al proceso ya descrito de 1,2-acilmigración experimentado por los monoglicéridos, y favorecido a su vez por el medio de reacción alcalino [157, 175 -179].

Tabla 3.2. Efecto del tiempo de reacción en la conversión y rendimiento de las reacciones de transesterificación utilizando PPL en forma libre como catalizador. ^a

Tiempo (minutos)	FAEE (%)	MG+DG (%)	TG (%)	Conv. (%)
5	66.2	16.5	17.3	83.1
10	70.7	16.1	13.2	86.5
15	74.5	14.1	11.4	88.1
20	70.4	14.9	14.7	85.7
25	72.1	15.1	12.8	87.2
30	72.8	14.3	12.9	86.4
40	73.3	17.5	9.2	92.1
50	81	19	-	>99
60	81.8	18.2	-	>99

^a Condiciones de reacción: 12 ml (0.01 mol) aceite de girasol, 6 mL etanol, 0.01 g PPL, 50°C, 1 h de reacción, pH 12 (alcanzado a través de la adición de 0.1 ml de NaOH 10 N) y 500 r.p.m.

3.1.1.3

INFLUENCIA DE LA CANTIDAD DE PPL EN EL MEDIO DE REACCION

Para evaluar la influencia del peso de enzima utilizado en las reacciones de transesterificación, bajo las condiciones experimentales siguientes (relación aceite/etanol 2/1, pH 12, 50 °C, 500 r.p.m. y 30 minutos de reacción), se han llevado a cabo una serie de experimentos en los que se ha ido aumentando

progresivamente la cantidad de biocatalizador (PPL) en el medio de reacción (desde 0.01 á 0.06 g).

Tabla 3.3. Rendimiento, conversión y TOF, del biodiesel obtenido en las reacciones de transesterificación de aceite de girasol empleando diferentes cantidades de PPL en forma libre.^a

PPL	FAEE	MG+DG	TG	Conv.	Rend.	TOF
(mg)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(g_{FAEE}/h g_{PPL})
10	66.4	16.3	17.3	82.7	66.4	604.2
20	71.1	9.6	19.3	80.7	71.1	323.5
40	84.4	9.8	5.8	94.2	84.4	192
60	73.8	10.8	15.4	84.6	73.8	111.9

^a Condiciones de reacción: 12 ml (0.01 mol) aceite de girasol, 6 ml etanol, 0.01 g PPL, 50°C, 30 minutos de reacción, pH 12 (alcanzado a través de la adición de 0.1 ml de NaOH 10 N) y 500 r.p.m.

Como puede verse en la **Tabla 3.3**, las cantidades crecientes de PPL utilizadas producen un leve efecto en la conversión. Tan solo se observa un ligero, pero visible, aumento tanto en la conversión como en los rendimientos a FAEE, desde la adición de 10 á 40 mg (0.1 - 0.4 %) de PPL, a partir de los cuales se vuelve a producir un descenso en la conversión. Este hecho puede posiblemente ser debido a la formación de agregados entre las moléculas de enzima (visibles incluso directamente en el matraz de reacción) que impiden que muchas de ellas tengan sus centros activos accesibles a los sustratos de la reacción.

3.1.1.4

INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN LA
ACTIVIDAD DE LA PPL

Dado el importante incremento de actividad enzimática a tiempos iniciales de reacción, respecto a los previamente calculados a mayores tiempos de reacción [25], se ha procedido a estudiar la cinética de las reacciones a diferentes temperaturas en el intervalo 40 – 60 °C, ya que es donde la PPL muestra mayor actividad [23]. Para ello se ha tomado como estándar un tiempo de reacción intermedio de 60 minutos. Así, para estudiar el efecto de la temperatura sobre la actividad de la PPL, frente a la transesterificación del aceite de girasol, se han llevado a cabo una serie de reacciones en condiciones fijas (relación aceite etanol 2/1, 0.01 g PPL, 0,1 ml NaOH 10 N y 500 r.p.m.) a tiempos de reacción de 60 minutos y a tres diferentes temperaturas. Los resultados se muestran en la **Tabla 3.4**.

Se puede comprobar cómo al aumentar la temperatura se produce una disminución tanto de la velocidad del proceso, expresada como TOF, como de las conversiones. A 40 °C se obtiene prácticamente el 100 % de conversión a los 60 minutos de reacción, con rendimientos en torno al 70 % en FAEE.

Tabla 3.4. Composición, rendimiento, conversión y velocidad, TOF, del biodiesel obtenido a varias temperaturas de reacción.^a

Temperatura (°C)	FAEE (%)	M+D (%)	TG (%)	Conv. (%)	TOF (g_{FAEE}/h g_{PPL})
40 ^b	71,1	28,9	-	>99	1294
50 ^b	69,9	15,6	14,5	85,5	1272.2
60 ^b	65,2	15,4	19,4	80,6	1186.6

^a Condiciones de reacción: 12 ml (0.01 mol) aceite de girasol, 0.01 g PPL, 60 minutos de reacción, pH 12 (alcanzado) a través de la adición de 0.1 ml de NaOH 10 N) y 500 r.p.m.

^b aceite/etanol ratio 2/1 (12 ml aceite/6 mL etanol).

3.1.1.5

EFECTO DEL CONTENIDO DE AGUA DEL MEDIO DE REACCIÓN

Las reacciones de alcoholólisis no implican la participación de moléculas de agua, por el contrario, su presencia puede promover la hidrólisis de ésteres, reduciendo así el rendimiento de la transesterificación [1,173]. No obstante, cuando dicha reacción está catalizada por lipasas, la cantidad de agua presente en el medio de reacción es un parámetro de vital importancia para que la enzima adquiera y conserve una conformación activa. Por ello se ha estudiado la influencia del contenido de agua en el medio, adicionando cantidades crecientes de agua en las siguientes condiciones de reacción: relación volumétrica aceite/etanol 12/6, 0.01 g PPL, 40 °C, pH 12 (0,1 ml NaOH 10 N), 30 minutos de reacción y 500 r.p.m. Los resultados se resumen en la **Tabla 3.5**.

Tabla 3.5. Conversión y viscosidad cinemática del biodiesel obtenido con diferentes contenidos de agua en el medio de reacción.^a

Contenido H₂O añadido (%)	Conversión (%)	Viscosidad cinemática 40°C (cSt)
0	89.6	6.2
0.3	84.2	12.6
0.6	54.8	13.8
1.1	34.5	16.9
2.2	14.2	19.4
4.4	15.5	22.0

^a Condiciones de reacción: 12 ml (0.01 mol) aceite de girasol, 2 ml etanol, 0.01 g PPL, 30 minutos de reacción, pH 12 (alcanzado a través de la adición de 0.1 ml de NaOH 10 N) y 500 r.p.m.

Se observa claramente cómo se produce un gran descenso en la conversión a partir de la presencia de solo un 0.3 % de agua en el medio, a partir de aquí se obtiene un rápido descenso con la presencia de relativamente pequeñas cantidades de agua.

3.1.1.6

EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE HIDRÓXIDO DE SODIO UTILIZADA PARA AJUSTAR EL pH DEL MEDIO DE REACCIÓN

Se han llevado a cabo una serie de experimentos utilizando un volumen constante de disolución alcalina (0.1 ml), pero con concentraciones variables de NaOH, utilizada para el ajuste del pH, con la finalidad de estudiar la influencia del pH en la actividad de la PPL en condiciones óptimas de reacción y a varias proporciones volumétricas de aceite/etanol. Los resultados se resumen en la **Tabla 3.6**.

Se observan altos valores de conversión (cercaos al 80 %) a relaciones de aceite/alcohol significativamente distintas, modificando simplemente la concentración de NaOH utilizada, lo que, parece indicar que no solo el agua ejerce una gran influencia, sino también la fuerza iónica del medio de reacción.

Tabla 3.6. Conversión de diferentes muestras de biodiesel obtenido con diferentes concentraciones de NaOH y volúmenes de disolución de NaOH constantes en el medio de reacción, y para diferentes proporciones volumétricas aceite/etanol.^a

[NaOH] (N)	Conversión	Conversión	Conversión	Conversión
	(%)	(%)	(%)	(%)
	12/1.5 (v/v)	12/2.0 (v/v)	12/3.5 (v/v)	12/6.0 (v/v)
1	12.3	21.3	15.1	15.5
2	17.9	34.8	22.1	22.7
3	22.6	39.9	27.9	28.7
4	27.5	52.3	36.0	36.8
5	20.5	57.1	42.4	42.9
6	17.1	67.0	50.3	50.9
7	14.7	68.9	53.2	53.7
8	14.9	52.2	53.2	61.6
9	15.9	52.8	57.9	67.2
10	19.0	19.3	65.0	72.7

^a Condiciones de reacción: 12 ml (0.01 mol) aceite de girasol, 0.01 g PPL, 1 h de reacción, 60 °C y 500 r.p.m.

3.2

LIPOPAN 50 BG

La lipasa *Lipopan 50 BG* (en adelante L50BG) suministrada por la empresa Novozymes®, es una lipasa comercializada para corregir las propiedades de harinas duras para la producción de pan de gran calidad.

Se trata de una lipasa purificada de carácter 1,3-regioselectivo obtenida a partir del microorganismo *Thermomyces lanuginosus* a través de un proceso de crecimiento por inmersión del organismo *Aspergillus oryzae* que actúa como hospedador.

Existen en la bibliografía multitud de trabajos dedicados a la producción de biodiesel a partir de diferentes aceites y alcoholes mediante la utilización de esta lipasa, aunque es cierto que la gran mayoría de ellos se centran en la utilización de la enzima inmovilizada comercialmente (Lipozyme TL IM) o con métodos de inmovilización particulares [178 - 182]. En la mayoría de los casos se necesitan tiempos de reacción de entre 10 y 24 horas, con cargas de enzima superiores al 10 % con respecto al peso de aceite utilizado y con contenidos bajos de agua, además, las conversiones suelen ser muy bajas excepto en los casos en los que se provoca el proceso de acil-migración anteriormente descrito.

3.2.1

EFEECTO DE LAS VARIABLES EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Para evaluar la actividad catalítica y optimizar las condiciones de reacción de esta enzima, se ha llevado a cabo un diseño experimental

multivariable en el que se ha analizado la influencia de la temperatura, el pH y la relación aceite/alcohol, así como la magnitud de esta influencia.

Antes de llevar a cabo el diseño experimental, se realizó un estudio más pormenorizado de la influencia de la cantidad de enzima utilizada y del agua presente en el medio de reacción, ya que se sabía de antemano que son variables fuertemente influyentes y por eso se han estudiado por separado simplificando así el diseño experimental.

El estudio de la influencia de la cantidad de enzima utilizada y del agua presente en el medio de reacción ha seguido la metodología O.V.A.T., por la que se han fijado unas condiciones iniciales de pH, temperatura y relación aceite/alcohol, y se han ido modificando las variables de estudio de una en una. Este método no aporta información sobre el efecto conjunto de varios parámetros de reacción pero sí nos brinda una información detallada de la variable en estudio.

3.2.1.1

EFFECTO DEL AGUA AÑADIDA

Para estudiar el efecto del agua presente en el medio de reacción, se ha realizado una serie de experimentos en los que se ha fijado el pH, la relación aceite/etanol y la temperatura (pH 12, por adición de 75 μ l de disolución acuosa de NaOH 10 N, relación volumétrica aceite/etanol 12/3.5, temperatura 20 °C y 20 mg de enzima), y se ha incrementado progresivamente la cantidad de agua presente en el medio de reacción.

Antes de comenzar cada reacción se añade la cantidad establecida de agua desionizada y se deja la muestra en agitación con el aceite durante unos 15 minutos para que el sistema se homogenice y estabilice.

Los resultados obtenidos en esta serie de experimentos se muestran en la **Tabla 3.7**.

Tabla 3.7. Efecto de la adición de agua en la composición y viscosidad del biodiesel obtenido.

Conversión (%)	FAEE (%)	MG+DG (%)	Viscosidad (mm²/s)	Cantidad Agua (% peso)
60.4	45.0	15.4	9.6	0.05
66.6	47.6	19.0	9.4	0.11
68.3	45.8	15.3	8.9	0.16
67.9	40.2	27.8	9.1	0.21
65.9	45.2	20.7	9.7	0.28
56.3	28.4	15.3	10.4	0.33
48.7	26.5	24.8	11.9	0.38

^a Condiciones de reacción: 12 ml (0.01 mol) aceite de girasol, 3.5 ml etanol, 0.02 g PPL, pH 12, 1 h de reacción, 20 °C y 500 r.p.m.

Puede observarse como existe un máximo en la conversión y un mínimo en la viscosidad cinemática de las muestras cuando se añade aproximadamente entre un 0.16 - 0.21 % en peso con respecto al peso de aceite utilizado.

3.2.1.2

EFFECTO DE LA CANTIDAD DE LIPASA

Para evaluar el efecto de la cantidad de enzima añadida al medio de reacción, se ha llevado a cabo una serie de experimentos en la que se han fijado las condiciones de reacción (pH 12, por adición de 75 µl de disolución acuosa de NaOH 10 N, relación aceite/etanol 12/3.5, temperatura 20 °C y 0.20 % de agua añadido).

Los resultados de estos experimentos se muestran en la **Tabla 3.8**, donde se observa como se produce un crecimiento continuo en la conversión con la adición de cantidades crecientes de enzima al sistema. Este aumento de conversión está acompañado de un descenso en la viscosidad cinemática de las muestras.

Tabla 3.8. Resultados de los experimentos realizados para evaluar la influencia del peso de lipasa utilizado.

Conversión (%)	FAEE (%)	MG+DG (%)	Viscosidad (mm²/s)	Peso Lipasa (mg)
55.9	42.3	26.8	9.5	2.1
63.3	40.2	27.8	9.4	5.5
67.9	40.4	22.9	9.3	10.5
69.1	39.6	16.3	9.0	20.3
73.0	56.8	16.2	8.5	30.2
51.7	26.2	13.1	11.8	40.1
46.3	23.5	12.8	13.4	50.3

^a Condiciones de reacción: 12 ml (0.01 mol) aceite de girasol, 3.5 ml etanol, pH 12, 1 h de reacción, 20 °C, 0.20 % agua añadida y 500 r.p.m.

3.2.1.3

DISEÑO EXPERIMENTAL PARA L50BG

Como ya se ha indicado anteriormente, se ha realizado un diseño experimental factorial multinivel con la finalidad de analizar la influencia de la temperatura, el pH y la relación aceite/alcohol, así como la magnitud de esta influencia. Para ello se han fijado unos límites a cada variable y se ha estudiado el efecto de las variables en la conversión, la cantidad de FAEE obtenidos y la viscosidad cinemática de la mezcla final.

Los intervalos de estudio para pH van desde 8 á 12, la temperatura entre 20 - 60 °C y relaciones volumétricas aceite/etanol entre 12/2 - 12/3.5,

lo que equivale a relaciones molares de 1/3 - 1/5 aproximadamente. Se ha fijado la cantidad de agua añadida al medio de reacción en 0.20 % y el peso de la enzima en 30 mg para todas las reacciones del diseño experimental.

En la **Tabla 3.9** se muestran los parámetros analizados en el diseño experimental, así como los valores usados como códigos en las matrices del análisis y sus correspondientes valores reales. Cada experimento se ha realizado por duplicado para asegurar la reproducibilidad de cada reacción y mejorar así el modelo.

Tabla 3.9. Parámetros analizados en el diseño factorial: códigos utilizados y valores reales.

Variables	Unidad	Niveles		
		-1	0	1
Temperatura	°C	20	40	60
Aceite/Etanol ratio (v/v)	ml/ml	12/2	-	12/3.5
pH	-	8	10	12

El diseño llevado a cabo consta de 18 experimentos (*runs*) que son llevados a cabo por duplicado y en forma aleatoria para minimizar posibles errores. La secuencia de experimentos a realizar se muestra en la **Tabla 3.10**.

Una vez realizados los 36 experimentos correspondientes al diseño propuesto y obtenidos los resultados de los análisis de composición y viscosidad cinemática para cada reacción efectuada, se completó el mismo diseño con los datos experimentales (variables respuesta) y se realizó el análisis de los datos con el software Statgraphics®, el cual se vale de la aplicación de un método de análisis multivariable (ANOVA) para establecer las relaciones entre las variables en estudio.

Se realizó el análisis de los datos para diferentes variables de salida (variables independientes), como son conversión, contenido en FAEE y viscosidad cinemática, para tratar de establecer una correlación entre los valores obtenidos para estas variables y los parámetros de reacción estudiados (temperatura, relación aceite/etanol y pH), cuyos resultados se muestran en los siguientes apartados.

Tabla 3.10. Matriz de experimentos del diseño factorial y las respuestas obtenidas para la conversión, contenido en FAEE y viscosidad cinemática para la primera y segunda series.

Run	Variables estudiadas			Variables de salida		
	Temperatura	pH	Aceite/Etanol ratio	Conversión (%)	FAEE (%)	Viscosidad cinemática (mm ² s ⁻¹)
1	1	0	-1	28.9	10.0	19.5
2	1	-1	-1	43.7	9.0	10.3
3	0	-1	-1	30.7	11.5	14.6
4	-1	0	-1	37.5	12.3	14.5
5	-1	1	1	67.1	46.9	8.9
6	1	1	1	54.3	35.6	9.8
7	-1	-1	-1	39.1	13.7	14.6
8	0	1	-1	48.8	25.2	14.6
9	0	0	1	53.6	24.2	9.8
10	0	0	-1	42.8	17.6	14.2
11	0	1	1	66.7	43.5	9.1
12	1	1	-1	47	23.0	14.7
13	1	-1	1	45	11.6	9.9
14	1	0	1	49.1	17.5	10.6
15	-1	0	1	46.6	24.4	10
16	-1	-1	1	48.9	29.6	9.2
17	0	-1	1	37.8	13.4	10.1
18	-1	1	-1	51.8	34.1	16.5

Repetición de experimentos						
Run	Temperatura	pH	Aceite/Etanol ratio	Conversión (%)	FAEE (%)	Viscosidad cinemática (mm ² s ⁻¹)
19	0	0	-1	42.9	18.2	14.1
20	-1	1	1	68.4	46.7	8.7
21	-1	-1	-1	38.7	13.1	16.2
22	-1	0	1	45.1	22.7	10.5
23	1	-1	1	46.2	23.3	9.6
24	0	-1	1	36.2	12.8	10.2
25	-1	-1	1	50.1	31.3	9.1
26	0	0	1	54.1	23.9	9.3
27	1	1	1	55.1	25.3	9.4
28	0	-1	-1	28.9	9.1	14.7
29	1	1	-1	45.8	23.0	14.8
30	-1	0	-1	38.2	12.3	14.5
31	1	0	-1	29.2	10.9	20.2
32	1	0	1	48.4	28.3	10.9
33	0	1	-1	47.4	24.6	14.9
34	0	1	1	65.4	42.9	9.3
35	1	-1	-1	41.9	15.4	10.9
36	-1	1	-1	52.3	33.5	14.8

3.2.1.4

ANÁLISIS DE LOS DATOS

A partir de los datos mostrados en la **Tabla 3.10** y mediante el software Statgraphics, se ha realizado un análisis estadístico multivariable (ANOVA) para determinar la correlación o "efectos" de las variables experimentales estudiadas con las variables de salida estudiadas (conversión, contenido en FAEE y viscosidad cinemática).

El software nos brinda diferentes salidas de datos que nos permiten analizar la influencia de las variables independientes en la variable dependiente en estudio.

3.2.1.4.1

RESULTADOS PARA CONVERSIÓN

Los datos experimentales obtenidos para la variable de salida conversión se muestran en la **Tabla 3.10**.

En la **Tabla 3.11** se muestran los datos obtenidos del análisis inicial de los datos, teniendo en cuenta a todas las variables experimentales estudiadas así como sus interacciones de segundo orden, o sea, interacciones de unas con otras en pares.

En esta tabla se muestran los valores de los efectos de todas las variables así como los errores estándar en su determinación y los coeficientes V.I.F. (Factor de Inflación de Varianza), que al tener todos un valor de 1 es indicativo de la ortogonalidad y colinealidad del modelo, por lo que es analizable mediante éste método.

Tabla 3.11. Efectos estimados para la variable Conversión.

Efecto	Estimado	Error Estándar	V.I.F.
Promedio	42,8167	1,89109	
A:Temperatura	-4,1	2,07159	1,0
B:pH	15,2417	2,07159	1,0
C:Aceite/Etanol ratio	11,25	1,69145	1,0
AA	0,65	3,5881	1,0
AB	-4,675	2,53717	1,0
AC	-0,583333	2,07159	1,0
BB	10,375	3,5881	1,0
BC	3,55833	2,07159	1,0
Bloque	-0,283333	1,69145	1,0

Errores estándar basados en el error total con 26 g.l.

En la siguiente **Tabla 3.12**, se muestran los resultados del análisis de varianza (ANOVA) llevado a cabo con los datos experimentales obtenidos para el modelo anteriormente diseñado. Se destacan en cursiva los datos con un valor $P < 0.05$, los cuales indican que esa interacción entre variables tiene un efecto significativo sobre la conversión. En este caso, se ha demostrado que las variables que tienen un efecto significativo sobre la conversión son la relación aceite/etanol y el pH, tanto en una relación simple como de forma cuadrática.

Tabla 3.12. Análisis de Varianza (ANOVA) para la variable Conversión.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Temperatura	100,86	1	100,86	3,92	0,0585
B:pH	1393,85	1	1393,85	54,13	<i>0,0000</i>
C:Aceite/Etanol ratio	1139,06	1	1139,06	44,24	<i>0,0000</i>
AA	0,845	1	0,845	0,03	0,8577
AB	87,4225	1	87,4225	3,40	0,0768
AC	2,04167	1	2,04167	0,08	0,7805
BB	215,281	1	215,281	8,36	<i>0,0076</i>
BC	75,9704	1	75,9704	2,95	0,0977
Bloques	0,7225	1	0,7225	0,03	0,8683
Error total	669,471	26	25,7489		
Total (correlación)	3685,53	35			

$R^2 = 81,8351 \%$

R^2 (ajustada por g.l.) = 76,4529 %

Error estándar del estimado = 5,07434 %

Error absoluto medio = 3,64468 %

También se muestran al pie de la tabla los coeficientes de correlación R^2 y R^2 ajustado, que permiten conocer el grado de ajuste de los datos al modelo propuesto, teniendo en este caso valores aceptables [183, 184, 185] tratándose de un sistema enzimático complejo y afectable por muchas variables. El R^2 ajustado nos permite comparar el modelo con otros distintos independientemente de que el número de variables estudiadas en uno y otro sea diferente, ya que es un coeficiente ajustado al número de grados de libertad del modelo estudiado.

El software permite también obtener una ecuación, cuyos coeficientes se muestran en la **Tabla 3.13**, que describe el modelo creado y da soluciones para la variable dependiente en función de las combinaciones entre las variables independientes, sean o no significativas en la respuesta.

Tabla 3.13. Coeficientes de regresión de la ecuación propuesta para la variable Conversión.

Coefficiente	Estimado
Constante	42,8167
A:Temperatura	-2,05
B:pH	7,62083
C:Aceite/Etanol ratio	5,625
AA	0,325
AB	-2,3375
AC	-0,291667
BB	5,1875
BC	1,77917

La ecuación del modelo ajustado es:

$$\begin{aligned} \text{Conversión} = & 42,8167 - 2,05*T + 7,62083*pH + 5,625*R + 0,325*T^2 \\ & - 2,3375*T*pH - 0,291667*T*R + 5,1875*pH^2 + \\ & 1,77917*pH*R \end{aligned}$$

T; Temperatura
pH; pH
R; Aceite/Etanol ratio

En la siguiente **Tabla 3.14**, se muestran los resultados estimados, usando la ecuación anterior, para la variable Conversión.

Tabla 3.14. Resultados Estimados para la variable Conversión.

Fila	Valores observados	Valores ajustados
1	28,9	35,9
2	43,7	37,5833
3	30,7	36,6792
4	37,5	39,4167
5	67,1	68,175
6	54,3	58,8167
7	39,1	36,425
8	48,8	48,3625
9	53,6	48,5833
10	42,8	37,3333
11	66,7	63,1708
12	47,0	44,5917
13	45,0	44,6917
14	49,1	46,5667
15	46,6	51,25
16	48,9	44,7
17	37,8	44,3708
18	51,8	52,7833
19	42,9	37,05
20	68,4	67,8917
21	38,7	36,1417
22	45,1	50,9667
23	46,2	44,4083
24	36,2	44,0875
25	50,1	44,4167
26	54,1	48,3
27	55,1	58,5333
28	28,9	36,3958
29	45,8	44,3083
30	38,2	39,1333
31	29,2	35,6167
32	48,4	46,2833
33	47,4	48,0792
34	65,4	62,8875
35	41,9	37,3
36	52,3	52,5

Si se considera ahora la posibilidad de excluir del modelo propuesto las variables que según el análisis ANOVA han resultado ser no significativas para explicar la conversión, el modelo resultante quedaría simplificado y seguiría explicando en gran medida la variabilidad presente en los experimentos.

Para ello se han eliminado del modelo inicial todas las variables excepto pH, la relación aceite/etanol y la interacción de segundo orden pH - pH. De esta forma se obtienen nuevos datos que nos permiten obtener un modelo más simplificado, como se muestra en las **Tablas 3.15** a **3.17**.

Tabla 3.15. Efectos estimados para la variable Conversión

Efecto	Estimado	Error Estándar	V.I.F.
Promedio	43,0333	1,58675	
B:pH	15,2417	2,244	1,0
C: Aceite/Etanol ratio	11,25	1,83222	1,0
BB	10,375	3,88672	1,0
Bloque	-0,28333	1,83222	1,0

Errores estándar basados en el error total con 31 g.l.

Tabla 3.16. Análisis de Varianza (ANOVA) para la variable Conversión

Fuente	Suma de Cuadrados	G1	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
B:pH	1393,85	1	1393,85	46,13	0,0000
C: Aceite/Etanol ratio	1139,06	1	1139,06	37,70	0,0000
BB	215,281	1	215,281	7,13	0,0120
Bloques	0,7225	1	0,7225	0,02	0,8781
Error total	936,611	31	30,2133		
Total (correlación)	3685,53	35			

$R^2 = 74,5868 \%$

R^2 (ajustada por g.l.) = 72,2043 %

Error estándar del estimado = 5,49666 %

Error absoluto medio = 4,33704 %

Como se puede observar, los valores de R^2 y R^2 ajustado son un poco más bajos al simplificar el modelo, pero siguen explicando alrededor del 75 % de la variabilidad.

Tabla 3.17. Coeficientes de regresión de la ecuación propuesta para la variable Conversión.

Coefficiente	Estimado
Constante	43,0333
B:pH	7,62083
C: Aceite/Etanol ratio	5,625
BB	5,1875

La ecuación simplificada del nuevo modelo ajustado es:

$$\text{Conversión} = 43,0333 + 7,62083 \cdot \text{pH} + 5,625 \cdot R + 5,1875 \cdot \text{pH}^2$$

T; Temperatura

pH; pH

R; Aceite/Etanol ratio

Se puede observar cómo al eliminar del modelo las variables no significativas, el sistema queda descrito por una ecuación mucho más simple y con unos estadísticos adecuados para sistemas bioquímicos.

3.2.1.4.2

RESULTADOS PARA CONTENIDO EN FAEE

En la **Tabla 3.18** se muestran los valores de los efectos de todas las variables así como los errores estándar en su determinación y los coeficientes V.I.F, que al tener todos un valor de 1, es indicativo de que el modelo es perfectamente ortogonal y por tanto analizable mediante este método.

En la siguiente **Tabla 3.19**, se muestran los resultados del análisis de varianza (ANOVA) llevado a cabo con los datos experimentales obtenidos para el modelo anteriormente diseñado. Se destacan en cursiva los valores con un valor $P < 0.05$, los cuales indican que esa interacción entre variables tiene un efecto significativo sobre la conversión. En este caso, se ha encontrado que todas las variables estudiadas tienen un efecto significativo sobre el contenido en FAEE, no siendo así para las interacciones de segundo orden entre las variables, excepto la interacción pH - pH, que sí es estadísticamente significativa.

En la **Tabla 3.20** se pueden ver los coeficientes de la ecuación propuesta por el software para describir el modelo creado y las soluciones para la variable dependiente en función de las combinaciones entre las variables independientes, sean o no significativas en la respuesta.

Tabla 3.18. Efectos estimados para la variable contenido en FAEE

Efecto	Estimado	Error Estándar	V.I.F.
Promedio	17,9778	1,81572	
A:Temperatura	-7,30833	1,98902	1,0
B:pH	17,5417	1,98902	1,0
C:Aceite/Etanol ratio	10,4111	1,62403	1,0
AA	1,64167	3,44509	1,0
AB	-3,2375	2,43605	1,0
AC	-2,69167	1,98902	1,0
BB	12,7917	3,44509	1,0
BC	2,275	1,98902	1,0
Bloque	0,788889	1,62403	1,0

Errores estándar basados en el error total con 26 g.l.

Tabla 3.19. Análisis de Varianza (ANOVA) para la variable contenido en FAEE

Fuente	Suma de Cuadrados	G1	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Temperatura	320,47	1	320,47	13,50	0,0011
B:pH	1846,26	1	1846,26	77,78	0,0000
C: Aceite/Etanol ratio	975,521	1	975,521	41,10	0,0000
AA	5,39014	1	5,39014	0,23	0,6377
AB	41,9256	1	41,9256	1,77	0,1954
AC	43,4704	1	43,4704	1,83	0,1876
BB	327,253	1	327,253	13,79	0,0010
BC	31,0538	1	31,0538	1,31	0,2631
Bloques	5,60111	1	5,60111	0,24	0,6312
Error total	617,169	26	23,7373		
Total (correlación)	4214,12	35			

R² = 85,3547 %

R² (ajustada por g.l.) = 81,0154 %

Error estándar del estimado = 4,87209 %

Error absoluto medio = 3,28816 %

Tabla 3.20. Coeficientes de regresión para la variable contenido en FAEE.

Coeficiente	Estimado
Constante	17,9778
A:Temperatura	-3,65417
B:pH	8,77083
C:Aceite/Etanol ratio	5,20556
AA	0,820833
AB	-1,61875
AC	-1,34583
BB	6,39583
BC	1,1375

La ecuación del modelo ajustado es:

$$FAEE = 17,97 - 3,65 * T + 8,77 * pH + 5,20 * R + 0,82 * T^2 - 1,61 * T * pH - 1,34 * T * R + 6,39 * pH^2 + 1,13 * pH * R$$

T; Temperatura

pH; pH

R; Aceite/Etanol ratio

En la **Tabla 3.21**, se pueden observar los resultados obtenidos al introducir las variables utilizadas en cada experimento en la ecuación que describe al modelo anteriormente obtenido, así como el resultado experimental obtenido. La comparación entre ambos nos ofrece una idea clara de cómo el modelo explica la observación experimental.

Como se puede ver en la **Figura 3.19**, donde las variables que tienen un efecto significativo en el contenido en FAEE están marcadas en cursiva, no todas las variables tenidas en cuenta en el análisis de los datos tienen un efecto significativo en la variable de salida en estudio. Es por ello, por lo que en este caso, como en el anterior, referido a la variable de salida conversión, se puede rehacer el modelo eliminando las variables que no ejercen un efecto significativo en el contenido en FAEE, simplificando de esta forma el modelo que describe al sistema estudiado.

Para ello, se han eliminado del modelo inicial todas las interacciones de segundo orden entre las variables, excepto la interacción pH - pH. De esta forma se obtiene un nuevo modelo más simplificado, como se muestra en las **Tablas 3.22 á 3.24**.

Tabla 3. 21. Resultados Estimados para la variable contenido en FAEE.

Fila	Valores observados	Valores ajustados
1	10,0	10,8903
2	9,0	11,2715
3	11,5	11,1403
4	12,3	15,5069
5	46,9	46,5326
6	35,6	33,2951
7	13,7	12,6507
8	25,2	26,4069
9	24,2	22,7889
10	17,6	12,3778
11	43,5	39,0931
12	23,0	23,3007
13	11,6	16,716
14	17,5	18,6097
15	24,4	28,6097
16	29,6	23,4785
17	13,4	19,2764
18	34,1	31,1549
19	18,2	13,1667
20	46,7	47,3215
21	13,1	13,4396
22	22,7	29,3986
23	23,3	17,5049
24	12,8	20,0653
25	31,3	24,2674
26	23,9	23,5778
27	25,3	34,084
28	9,1	11,9292
29	23,0	24,0896
30	12,3	16,2958
31	10,9	11,6792
32	28,3	19,3986
33	24,6	27,1958
34	42,9	39,8819
35	15,4	12,0604
36	33,5	31,9437

Tabla 3.22. Efectos estimados para la variable contenido en FAEE

Efecto	Estimado	Error Estándar	V.I.F.
Promedio	18,525	1,43276	
A:Temperatura	-7,30833	2,02623	1,0
B:pH	17,5417	2,02623	1,0
C: Aceite/Etanol ratio	10,4111	1,65441	1,0
BB	12,7917	3,50953	1,0
Bloque	0,788889	1,65441	1,0

Errores estándar basados en el error total con 30 g.l.

Tabla 3.23. Análisis de Varianza (ANOVA) para la variable contenido en FAEE

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Temperatura	320,47	1	320,47	13,01	0,0011
B:pH	1846,26	1	1846,2	74,95	0,0000
C: Aceite/Etanol ratio	975,521	1	975,52	39,60	0,0000
BB	327,253	1	327,25	13,28	0,0010
Bloques	5,60111	1	5,6011	0,23	0,6369
Error total	739,009	30	24,633		
Total (correlación)	4214,12	35			

$R^2 = 82,4635 \%$

R^2 (ajustada por g.l.) = 80,2007 %

Error estándar del estimado = 4,96323 %

Error absoluto medio = 3,7473 %

Tabla 3.24. Coeficientes de regresión para la variable contenido en FAEE.

Coficiente	Estimado
Constante	18,525
A:Temperatura	-3,65417
B:pH	8,77083
C: Aceite/Etanol ratio	5,20556
BB	6,39583

La ecuación simplificada del nuevo modelo ajustado es:

$$\text{FAEE} = 18,52 - 3,65 \cdot T + 8,77 \cdot \text{pH} + 5,20 \cdot R + 6,39 \cdot \text{pH}^2$$

T; Temperatura

pH; pH

R; Aceite/Etanol ratio

Se puede observar cómo al eliminar del modelo las variables no significativas, el sistema queda descrito por una ecuación mucho más simple.

Además, es importante destacar que en este caso, al simplificar el modelo por eliminación de las variables no significativas, se produce una mejora en los valores de R^2 y R^2 ajustado del modelo, lo que indica que el modelo simplificado se ajusta mejor a la observación experimental.

3.2.1.4.3

RESULTADOS PARA VISCOSIDAD CINEMÁTICA

Se ha estudiado también la influencia de los principales parámetros de reacción en la viscosidad cinemática del biocombustible obtenido. Para ello se han realizado una serie de 18 experimentos (los mismos que para las variables de salida conversión y contenido en FAEE, **Tabla 3.10**) siguiendo un diseño experimental multifactorial, que mediante un análisis de la varianza, permitirá obtener la relación entre los principales parámetros de reacción (temperatura, pH y relación aceite/etanol) y la variable de salida Viscosidad cinemática.

En la **Tabla 3.25** se muestran los resultados del análisis donde se pueden observar los efectos de todas las variables así como los errores estándar en su determinación y los coeficientes V.I.F., que al tener todos un valor de 1 indican que el modelo es perfectamente ortogonal y por tanto analizable mediante éste método.

El software nos brinda diferentes salidas de datos que nos permiten analizar la influencia de las variables independientes en la variable dependiente en estudio.

Tabla 3.25. Efectos estimados para la variable de salida Viscosidad cinemática.

Efecto	Estimado	Error Estándar	V.I.F.
Promedio	12,9458	0,618053	
A:Temperatura	0,254167	0,677043	1,0
B:pH	0,504167	0,677043	1,0
C: Aceite/Etanol ratio	-5,23611	0,552803	1,0
AA	0,6875	1,17267	1,0
AB	1,01875	0,829205	1,0
AC	0,370833	0,677043	1,0
BB	-2,6125	1,17267	1,0
BC	-0,99583	0,677043	1,0
Bloque	0,063888	0,552803	1,0

Errores estándar basados en el error total con 26 g.l.

En la siguiente **Tabla 3.26**, se muestran los resultados del análisis de varianza (ANOVA) llevado a cabo con los datos experimentales obtenidos para el modelo anteriormente diseñado. Se destacan en cursiva los valores con un valor $P < 0.05$, los cuales indican que esa interacción entre variables tiene un efecto significativo sobre la conversión. En este caso, se ha obtenido que únicamente las variables relación aceite/etanol y la interacción de segundo orden de la variable pH, tienen efectos significativos en la viscosidad cinemática.

Tabla 3.26. Análisis de Varianza (ANOVA) para la variable de salida Viscosidad cinemática.

Fuente	Suma de Cuadrados	G1	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Temperatura	0,387604	1	0,387604	0,14	0,7104
B:pH	1,5251	1	1,5251	0,55	0,4632
C: Aceite/Etanol ratio	246,752	1	246,752	89,72	0,0000
AA	0,945313	1	0,945313	0,34	0,5628
AB	4,15141	1	4,15141	1,51	0,2302
AC	0,825104	1	0,825104	0,30	0,5886
BB	13,6503	1	13,6503	4,96	0,0348
BC	5,9501	1	5,9501	2,16	0,1533
Bloques	0,036736	1	0,0367361	0,01	0,9089
Error total	71,5085	26	2,75033		
Total (correlación)	345,732	35			

R² = 79,3168 %

R² (ajustada por g.l.) = 73,1884 %

Error estándar del estimado = 1,65841 %

Error absoluto medio = 1,01549 %

A continuación se muestra la **Tabla 3.27**, donde se pueden ver los coeficientes de la ecuación propuesta por el software para describir el modelo creado y que da soluciones para la variable dependiente en función de las combinaciones entre las variables independientes, sean o no significativas en la respuesta.

Tabla 3.27. Coeficientes de regresión para la variable de salida Viscosidad cinemática.

Coefficiente	Estimado
Constante	12,9458
A:Temperatura	0,127083
B:pH	0,252083
C:Aceite/Etanol ratio	-2,61806
AA	0,34375
AB	0,509375
AC	0,185417
BB	-1,30625
BC	-0,497917

La ecuación del modelo ajustado es:

$$\text{Viscosidad cinemática} = 12,94 + 0,12*T + 0,25*pH - 2,61*R + 0,34*T^2 + 0,50*T*pH + 0,18*T*R - 1,30*pH^2 - 0,49*pH*R$$

T; Temperatura

pH; pH

R; Aceite/Etanol ratio

En la siguiente **Tabla 3.28** se muestran los valores experimentales obtenidos para cada corrida del diseño experimental para la viscosidad cinemática a 40 °C frente a los valores ajustados por el modelo obtenido, observándose las diferencias entre los valores reales y ajustados según el modelo.

Para simplificar el resultado, se han eliminado del modelo inicial todas las interacciones de segundo orden entre las variables, excepto la interacción pH – pH, así como todos los parámetros de reacción, excepto la relación aceite/alcohol, ya que según el análisis ANOVA, son estos los únicos efectos significativos para esta variable de salida. De esta forma se obtiene un nuevo modelo más simplificado, como se muestra en las **Tablas 3.29** á **3.31**.

Tabla 3.28. Resultados Estimados para la variable de salida Viscosidad cinemática.

Fila	Valores observados	Valores ajustados
1	19,5	15,8174
2	10,3	13,2517
3	14,6	13,4757
4	14,5	15,934
5	8,9	8,26562
6	9,8	9,90937
7	14,6	14,3872
8	14,6	14,9757
9	9,8	10,2958
10	14,2	15,5319
11	9,1	8,74375
12	14,7	15,7705
13	9,9	9,38229
14	10,6	10,9521
15	10,0	10,3271
16	9,2	9,77604
17	10,1	9,23542
18	16,5	14,8684
19	14,1	15,5958
20	8,7	8,32951
21	16,2	14,451
22	10,5	10,391
23	9,6	9,44618
24	10,2	9,29931
25	9,1	9,83993
26	9,3	10,3597
27	9,35	9,97326
28	14,7	13,5396
29	14,8	15,8344
30	14,5	15,9979
31	20,2	15,8813
32	10,9	11,016
33	14,9	15,0396
34	9,3	8,80764
35	10,9	13,3156
36	14,8	14,9323

Tabla 3.29. Efectos estimados para la variable Viscosidad cinemática.

Efecto	Estimado	Error Estándar	V.I.F.
Promedio	13,175	0,471293	
C: Aceite/Etanol ratio	-5,23611	0,544203	1,0
BB	-2,6125	1,15443	1,0
Bloque	0,0638889	0,544203	1,0

Errores estándar basados en el error total con 32 g.l.

Tabla 3.30. Análisis de Varianza (ANOVA) para la variable Viscosidad cinemática.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
C: Aceite/Etanol ratio	246,752	1	246,752	92,58	0,0000
BB	13,6503	1	13,6503	5,12	0,0306
Bloques	0,0367361	1	0,036736	0,01	0,9073
Error total	85,2931	32	2,66541		
Total (correlación)	345,732	35			

R² = 75,3297 %

R² (ajustada por g.l.) = 73,8345 %

Error estándar del estimado = 1,63261 %

Error absoluto medio = 0,971952 %

Tabla 3.31. Coeficientes de regresión para Viscosidad cinemática.

Coefficiente	Estimado
constante	13,175
C: Aceite/Etanol ratio	-2,61806
BB	-1,30625

La ecuación simplificada del nuevo modelo ajustado es:

$$\text{Viscosidad cinemática} = 13,17 - 2,61 \cdot R - 1,30 \cdot \text{pH}^2$$

T; Temperatura

pH; pH

R; Aceite/Etanol

Se puede observar cómo al eliminar del modelo las variables no significativas, el sistema queda descrito por una ecuación mucho más simple y que continúa explicando aproximadamente el 75 % de la variabilidad producida en los experimentos.

Es importante destacar que, en este caso, al simplificar el modelo por eliminación de las variables no significativas, apenas se produce variación en los valores de R^2 y R^2 ajustado del modelo, lo que indica que el modelo simplificado se ajusta aproximadamente de igual forma a la observación experimental que el modelo más complejo que tiene en cuenta todas las variables y sus interacciones de segundo orden.

3.2.2

EXPERIMENTOS DE VALIDACIÓN DE LOS MODELOS

Para validar los modelos propuestos, se han llevado a cabo una serie de tres experimentos, cuyas condiciones de reacción han sido seleccionadas de entre el rango de estudio de las variables.

Para ello, en la **Tabla 3.32**, se muestran las condiciones de reacción y los datos de conversión, contenido en FAEE y viscosidad cinemática para cada experimento llevado a cabo. Se muestran tanto los valores experimentales obtenidos como los ajustados por cada modelo.

Tabla 3.32. Experimentos de validación de los modelos simplificados para la enzima Lipopan 50 BG.

Temperatura °C	pH	Aceite/Etanol ratio	Conversión (%)		FAEE (%)		Viscosidad (mm ² /s)	
			Exp.	Ajust.	Exp.	Ajust.	Exp.	Ajust.
25	11.5	12/2.9	40.6	42.9	43.5	41.5	9.0	9.8
30	10.5	12/2.75	46.7	43.9	26.2	27.0	11.7	11.0
50	9	12/2.3	47.6	51.8	18.8	17.3	12.1	11.1

3.2.3

INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA

Finalmente, para tener datos más precisos de la influencia de la temperatura, se han realizado una serie de experimentos en las condiciones óptimas anteriormente obtenidas pero haciendo ahora un barrido más amplio de temperatura. De esta forma queremos cerciorarnos de que realmente la enzima no presenta un máximo de actividad enmascarado en la zona de estudio y que presenta realmente una relación prácticamente lineal y de pendiente negativa.

Los datos de estos experimentos se muestran en la **Tabla 3.3**.

Tabla 3.33. Influencia de la temperatura en la actividad enzimática de la lipasa Lipopan 50 BG en el rango entre 20 y 60 °C.

Temperatura (°C)	Conversión (%)	FAEE (%)	MG+DG (%)	TG (%)	Viscosidad (mm²/s)	Peso Lipasa (mg)
20	68.9	47.9	20.9	31.1	8.4	5.2
30	61.0	40.6	20.5	39.9	8.8	5.1
35	57.7	31.4	26.3	42.3	9.9	5.5
40	53.2	39.3	13.9	46.7	9.4	5.4
50	53.3	36.8	16,5	46.7	9.9	5.5
60	48.6	40.9	7,7	51.4	9.0	5.2

Como puede observarse, se produce un descenso prácticamente lineal en la conversión al aumentar la temperatura de reacción.

3.3

BIOLIPASA R

La enzima *Biolipasa R* (en adelante LR), suministrada por la empresa Biocon®, es una lipasa comercializada para uso alimentario. Se trata de un preparado enzimático en forma de sólido fino que está mayoritariamente compuesto por lipasa purificada y de carácter 1,3-regioselectivo obtenida a partir del microorganismo *Rhizopus oryzae*.

La elección de esta enzima es muy interesante ya que se trata de una lipasa con una gran actividad lipolítica, de muy bajo coste y con una elevada regioselectividad [186]. Sería muy interesante optimizar las condiciones de reacción para que esta enzima lleve a cabo de forma eficiente la reacción de transesterificación de aceites. Aún más interesante sería poder inmovilizar dicha enzima, ya que tendríamos la oportunidad de reutilizarla por lo que el coste decrecería todavía más.

3.3.1

EFEECTO DE LAS VARIABLES EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Para llevar a cabo una evaluación de la actividad enzimática y optimizar las condiciones de reacción de esta enzima, se ha realizado un diseño experimental multivariable en el que se ha analizado la influencia de la temperatura, el pH y la relación aceite/etanol, así como la magnitud de esta influencia.

Antes de llevar a cabo el diseño experimental, se realizó, al igual que para la lipasa L50 BG, un estudio más pormenorizado de la influencia de la

cantidad de enzima utilizada y del agua presente en el medio de reacción, ya que se sabía de antemano que son variables fuertemente influyentes. Por ello ambas variables se han estudiado por separado, obteniendo así una información más detallada de su influencia, simplificando así el posterior diseño experimental. Dicho estudio ha seguido también en este caso la metodología O.V.A.T (*One Variable At Time*), por la que se han fijado unas condiciones iniciales de pH, temperatura y relación aceite alcohol, y se han ido modificando las variables de estudio de una en una.

3.3.1.1

EFFECTO DEL AGUA AÑADIDA

El efecto del agua presente en el medio de reacción se ha estudiado mediante la realización de una serie de experimentos en los que se han fijado el pH, la relación aceite/etanol y la temperatura a los mismos valores que los considerados para la lipasa L50 BG (pH 12, por adición de 75 μ L de disolución acuosa de NaOH 10 N, relación aceite/etanol 12/3.5, temperatura 30 °C y 20 mg de enzima), y se ha ido incrementando la cantidad de agua presente en el medio de reacción por adición de ésta.

Antes de comenzar cada reacción se añade la cantidad establecida de agua desionizada y se deja la muestra en agitación con el aceite durante unos 15 minutos para que el sistema se homogenice y estabilice.

Los resultados obtenidos en esta serie de experimentos se muestran en la **Tabla 3.34**, donde se puede observar como se alcanza un máximo de conversión y un mínimo de viscosidad con la adición de 0.15 % de agua al sistema.

Tabla 3.34. Efecto de la adición de agua en la composición y viscosidad del biodiesel obtenido.

Conversión (%)	FAEE (%)	MG+DG (%)	Viscosidad (mm²/s)	Cantidad Agua (% peso)
81.4	50.6	30.8	8.9	0.05
81.1	45.9	35.2	9.0	0.10
83.2	41.2	42.0	8.4	0.15
71.2	34.7	36.5	9.3	0.20
65.1	38.5	26.6	9.5	0.25

3.3.1.2

EFFECTO DE LA CANTIDAD DE LIPASA

Se ha llevado a cabo una serie de experimentos para evaluar el efecto de la cantidad de enzima añadida al medio de reacción. En estos experimentos se han fijado las condiciones de reacción (pH 12, por adición de 75 μ L de disolución acuosa de NaOH 10N, relación aceite/etanol 12/3.5, temperatura 20 °C y 0.15 % de agua añadida).

Los resultados de estos experimentos se muestran a continuación en la **Tabla 3.35**, donde se puede observar como existe un máximo de conversión con la adición de 20 mg de lipasa y un posterior decrecimiento con el aumento de la cantidad de lipasa añadida.

Tabla 3.35. Resultados de los experimentos realizados para evaluar la influencia del peso de lipasa utilizado.

Conversión (%)	FAEE (%)	MG+DG (%)	Viscosidad (mm²/s)	Peso Lipasa (mg)
65.9	29.4	36.5	9.3	1.0
72.8	33.0	39.8	9.2	2.0
78.1	34.9	43.2	9.0	5.2
78.8	35.9	42.9	9.4	10.0
82.5	33.1	49.4	8.5	20.5
75.2	30.4	44.8	9.4	30.5

3.3.1.3

DISEÑO EXPERIMENTAL PARA LA BIOLIPASA R

Como ya se ha indicado anteriormente, se ha realizado un diseño experimental factorial multinivel con la finalidad de analizar la influencia de la temperatura, el pH y la relación aceite/alcohol, así como la magnitud de esta influencia. Para ello se han fijado unos límites a cada variable y se ha estudiado el efecto de las variables en la conversión, la cantidad de FAEE obtenidos y la viscosidad cinemática de la mezcla final.

Los intervalos de estudio para pH van desde 8 á 12, la temperatura entre 20 - 60 °C y las relaciones volumétricas aceite/etanol entre 12/2 - 12/3.5, lo que equivale aproximadamente a relaciones molares de 1/3 - 1/5. Se ha fijado la cantidad de agua añadida al medio de reacción en 0.15 % y el peso de enzima en 20 mg, para todas las reacciones del diseño experimental.

En la **Tabla 3.36** se muestran los parámetros analizados en el diseño experimental, así como los valores normalizados usados en las matrices del análisis y sus correspondientes valores reales. Se ha llevado a cabo cada experimento por duplicado para asegurar la reproducibilidad de cada reacción y mejorar así el modelo.

Tabla 3.36. Parámetros analizados en el diseño factorial: códigos utilizados y valores reales.

Variables	Unidad	Niveles		
		-1	0	1
Temperature	°C	20	40	60
Aceite/Etanol ratio (v/v)	ml/ml	12/2	-	12/3.5
pH	-	8	10	12

El diseño propuesto consta de 18 experimentos (*runs*) que son llevados a cabo por duplicado y aleatorizados para minimizar los posibles errores. La secuencia de experimentos a realizar se muestra en la **Tabla 3.37**, así como los resultados obtenidos para la conversión y viscosidad cinemática para los 36 experimentos efectuados en el diseño, y los de los experimentos efectuados para validar el modelo una vez terminado.

Una vez realizadas las 36 reacciones test correspondientes al diseño experimental propuesto y obtenidos los resultados de los análisis de composición y viscosidad cinemática para cada reacción efectuada, se completó el diseño con los datos experimentales (variables respuesta) y se realizó el análisis de los datos con el software Statgraphics, el cual se vale de la aplicación de un método de análisis multivariable (ANOVA de varios factores) para estudiar la significancia estadística de cada variable.

Se realizó el análisis de los datos para diferentes variables de salida (variables independientes), como son: conversión, contenido en FAEE y viscosidad cinemática, para tratar de establecer una correlación entre los valores obtenidos para estas variables y los parámetros de reacción estudiados (temperatura, relación aceite/etanol y pH), cuyos resultados se muestran en los siguientes apartados.

Tabla 3.37. Matriz de experimentos del diseño factorial y las respuestas obtenidas para la conversión, contenido en FAEE y viscosidad cinemática tanto para la primera como para la segunda serie para la enzima Biolipasa R.

Run	Variables estudiadas			Variables de salida		
	Temperatura	pH	Aceite/Etanol ratio	Conversión (%)	FAEE (%)	Viscosidad cinemática (mm ² s ⁻¹)
1	-1	0	1	81.2	43.5	8.8
2	1	-1	-1	44.7	31.9	8.7
3	0	0	1	70	43.5	12.6
4	1	1	1	75.8	42.1	13.8
5	-1	1	1	83.6	47.6	9.8
6	0	1	-1	67.1	39.6	9.4
7	-1	-1	1	74.8	40.6	14
8	1	1	-1	55.5	34.8	13.5
9	1	0	-1	47.2	32.4	14.2
10	-1	1	-1	60	36.2	9.8
11	1	0	1	75.9	43.8	9.3
12	0	-1	-1	46.8	32.6	14.3
13	0	0	-1	51.6	32.4	13.3
14	0	-1	1	60.8	38.5	13.5
15	0	1	1	81.1	49.7	8.6
16	-1	-1	-1	47.9	32.6	9.1
17	1	-1	1	73.4	43.7	8.5
18	-1	0	-1	55	34.9	13.2

Repetición de experimentos							Viscosidad cinemática (mm ² s ⁻¹)
Run	Temperatura	pH	Aceite/Etanol ratio	Conversión (%)	FAEE (%)		
19	1	0	-1	46.2	31.5	14.3	
20	0	0	1	73.2	40.7	12.2	
21	0	-1	-1	47.2	31.9	14.1	
22	-1	0	-1	56.2	35.3	13.1	
23	1	1	-1	54.3	34.5	13.8	
24	-1	1	-1	58.1	35.7	9.4	
25	1	-1	1	74.7	43.1	8.3	
26	-1	-1	-1	48.2	32.6	9.2	
27	1	0	1	75	43.8	9.7	
28	0	1	1	83.3	46.9	8.2	
29	-1	-1	1	76.3	42.2	12.3	
30	-1	1	1	83.2	47.3	9.8	
31	0	0	-1	50.3	32.8	13.6	
32	1	1	1	74.3	42.9	13.9	
33	1	-1	-1	45.9	32.2	8.4	
34	0	1	-1	65.8	39.9	9.8	
35	0	-1	1	59.7	36.9	14	
36	-1	0	1	80.8	44.6	9	

3.3.1.4

ANÁLISIS DE LOS DATOS

A partir de estos datos y mediante el software Statgraphics, se ha realizado un análisis estadístico multivariable (ANOVA) para determinar la correlación o "efectos" de las variables experimentales estudiadas con las variables de salida (conversión, contenido en FAEE y viscosidad cinemática).

El software nos brinda diferentes salidas de datos que nos permiten analizar la influencia de las variables independientes en la variable dependiente en estudio.

3.3.1.4.1

RESULTADOS PARA LA CONVERSIÓN

Los datos experimentales obtenidos para la variable de salida conversión se muestran en la **Tabla 3.37**.

En la **Tabla 3.38** se muestran los datos obtenidos del análisis inicial de los datos, teniendo en cuenta a todas las variables experimentales estudiadas así como sus interacciones de segundo orden, o sea, interacciones de unas con otras a pares.

En esta tabla se muestran los valores de los efectos de todas las variables así como los errores estándar en su determinación y los coeficientes V.I.F. (Factor de Inflación de Varianza), que al tener todos un valor de 1 es indicativo de que el modelo es perfectamente ortogonal y por tanto analizable

mediante éste método, además de existir una gran colinealidad entre los efectos estudiados.

Tabla 3.38. Efectos estimados para la variable Conversión.

Efecto	Estimado	Error Estándar	V.I.F.
Promedio	62,5944	1,67228	
A:Temperatura	-5,2	1,8319	1,0
B:pH	11,8083	1,8319	1,0
C:Aceite/Etanol ratio	22,7278	1,49574	1,0
AA	2,86667	3,17294	1,0
AB	-2,0625	2,24361	1,0
AC	0,0666667	1,8319	1,0
BB	1,44167	3,17294	1,0
BC	-1,54167	1,8319	1,0
Bloque	0,0166667	1,49574	1,0

Errores estándar basados en el error total con 26 g.l.

En la **Tabla 3.39**, se muestran los resultados del análisis de varianza (ANOVA) llevado a cabo con los datos experimentales obtenidos para el modelo anteriormente diseñado. Se destacan en cursiva los valores con un valor $P < 0.05$, los cuales indican que esa interacción entre variables tiene un efecto significativo sobre la conversión. En este caso, se ha obtenido que las variables que tienen un efecto significativo sobre la conversión son la relación aceite/etanol, el pH y la temperatura.

Tabla 3.39. Análisis de Varianza (ANOVA) para la variable Conversión.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Temperatura	162,24	1	162,24	8,06	0,0087
B:pH	836,62	1	836,62	41,55	0,0000
C:Aceite/Etanol ratio	4648,97	1	4648,97	230,89	0,0000
AA	16,4356	1	16,4356	0,82	0,3746
AB	17,0156	1	17,0156	0,85	0,3664
AC	0,0266667	1	0,0266667	0,00	0,9712
BB	4,15681	1	4,15681	0,21	0,6533
BC	14,2604	1	14,2604	0,71	0,4077
Bloques	0,0025	1	0,0025	0,00	0,9912
Error total	523,511	26	20,1351		
Total (correlación)	6223,24	35			

R² = 91,5878 %

R² (ajustada por g.l.) = 89,0953 %

Error estándar del estimado = 4,48721 %

Error absoluto medio = 2,91902 %

También se muestran al pie de la tabla los coeficientes de correlación R² y R² ajustado, que permiten conocer el grado de ajuste de los datos al modelo obtenido, teniendo en este caso valores bastante significativos. El R² ajustado nos permite comparar el modelo con otros distintos independientemente de que el número de variables estudiadas en uno y otro sea diferente, ya que es un coeficiente ajustado al número de grados de libertad del modelo estudiado.

El software permite también obtener una ecuación, cuyos coeficientes se muestran en la **Tabla 3.40**, que describe el modelo creado y permite obtener soluciones para la variable dependiente en función de las combinaciones entre las variables independientes, sean o no significativas en la respuesta.

Tabla 3.40. Coeficientes de regresión de la ecuación propuesta para la variable Conversión.

Coefficiente	Estimado
Constante	62,5944
A:Temperatura	-2,6
B:pH	5,90417
C:Aceite/Etanol ratio	11,3639
AA	1,43333
AB	-1,03125
AC	0,0333333
BB	0,720833
BC	-0,770833

La ecuación del modelo ajustado es:

$$\text{Conversión} = 62,59 - 2,60 \cdot T + 5,90 \cdot \text{pH} + 11,36 \cdot R + 1,43 \cdot T^2 - 1,03 \cdot T \cdot \text{pH} + 0,03 \cdot T \cdot R + 0,72 \cdot \text{pH}^2 - 0,77 \cdot \text{pH} \cdot R$$

T; Temperatura

pH; pH

R; Aceite/Etanol v/v ratio

En la siguiente **Tabla 3.41**, se muestran los resultados estimados, usando la ecuación anterior, para la variable conversión.

Tabla 3.41. Resultados Estimados para la variable Conversión.

Fila	Valores Observados	Valores Ajustados
1	81,2	77,95
2	44,7	45,0993
3	70,0	73,95
4	75,8	77,6396
5	83,6	84,8354
6	67,1	58,6181
7	74,8	72,5062
8	55,5	56,3868
9	47,2	50,0222
10	60,0	63,716
11	75,9	72,8167
12	46,8	45,2681
13	51,6	51,2222
14	60,8	69,5375
15	81,1	79,8042
16	47,9	48,3035
17	73,4	69,4354
18	55,0	55,2889
19	46,2	50,0389
20	73,2	73,9667
21	47,2	45,2847
22	56,2	55,3056
23	54,3	56,4035
24	58,1	63,7326
25	74,7	69,4521
26	48,2	48,3201
27	75,0	72,8333
28	83,3	79,8208
29	76,3	72,5229
30	83,2	84,8521
31	50,3	51,2389
32	74,3	77,6563
33	45,9	45,116
34	65,8	58,6347
35	59,7	69,5542
36	80,8	77,9667

Si se considera ahora la posibilidad de excluir del modelo propuesto las variables que según el análisis ANOVA han resultado ser no significativas para explicar la conversión, el modelo resultante quedaría simplificado y seguiría explicando en gran medida la variabilidad presente en los experimentos.

Para ello se han eliminado del modelo inicial todas las variables excepto pH, relación aceite/etanol y la temperatura. De esta forma se obtienen nuevos datos que nos permiten obtener un modelo más simplificado, como se muestra en las **Tablas 3.42** á **3.44**.

Tabla 3.42. Efectos estimados para la variable Conversión

Efecto	Estimado	Error Estándar	V.I.F
Promedio	64,0306	0,718051	
A:Temperatura	-5,2	1,75886	1,0
B:pH	11,8083	1,75886	1,0
C:Aceite/Etanol ratio	22,7278	1,4361	1,0
Bloque	0,0166667	1,4361	1,0

Errores estándar basados en el error total con 31 g.l.

Tabla 3.43. Análisis de Varianza (ANOVA) para la variable Conversión

Fuente	Suma de Cuadrados	G1	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Temperatura	162,24	1	162,24	8,74	0,0059
B:pH	836,62	1	836,62	45,07	0,0000
C:Aceite/Etanol ratio	4648,97	1	4648,97	250,46	0,0000
Bloques	0,0025	1	0,0025	0,00	0,9908
Error total	575,407	31	18,5615		
Total (corr.)	6223,24	35			

$R^2 = 90,7539 \%$

R^2 (ajustada por g.l.) = 89,8871 %

Error estándar del estimado = 4,30831 %

Error absoluto medio = 2,99931

Como se puede observar, los valores de R^2 y R^2 ajustado son un poco más bajos al simplificar el modelo, pero siguen explicando algo más del 90 % de la variabilidad en la conversión.

Tabla 3.44. Coeficientes de regresión de la ecuación propuesta para la variable Conversión.

Coefficiente	Estimado
Constante	64,0306
A:Temperatura	-2,6
B:pH	5,90417
C:Aceite/Etanol ratio	11,3639

La ecuación simplificada del nuevo modelo ajustado es:

$$\text{Conversión} = 64,03 - 2,60 \cdot T + 5,90 \cdot \text{pH} + 11,36 \cdot R$$

siendo:

T; Temperatura
 pH; pH
 R; Aceite/Etanol v/v ratio

Se puede observar como al eliminar del modelo las variables no significativas, el sistema queda descrito por una ecuación mucho más simple, en este caso, sin efectos de segundo orden. Además, en todos los ensayos se obtiene un error estándar para el pronóstico del 4.3 %.

3.3.1.4.2

RESULTADOS PARA CONTENIDO EN FAEE

En la **Tabla 3.45** se muestran los valores de los efectos de todas las variables así como los errores estándar en su determinación y los coeficientes V.I.F, que al tener todos un valor de 1 es indicativo de que el modelo es perfectamente ortogonal y por tanto analizable mediante este método.

El software nos brinda diferentes salidas de datos que nos permiten analizar la influencia de las variables independientes en la variable dependiente en estudio.

En la **Tabla 3.46**, se muestran los resultados del análisis de varianza (ANOVA) realizado con los datos experimentales obtenidos para el modelo anteriormente diseñado. Se destacan en cursiva los valores con un valor $P < 0.05$, los cuales indican que esa interacción entre variables tiene un efecto significativo sobre la conversión. En este caso, se ha obtenido que todas variables estudiadas tienen un efecto significativo sobre el contenido en FAEE.

En la **Tabla 3.47** se pueden ver los coeficientes de la ecuación propuesta por el software para describir el modelo creado y que da soluciones para la variable dependiente en función de las combinaciones entre las variables independientes, sean o no significativas en la respuesta.

Tabla 3.45. Efectos estimados para la variable contenido en FAEE.

Efecto	Estimado	Error Estándar	V.I.F.
Promedio	38,2944	0,747621	
A:Temperatura	-1,36667	0,818978	1,0
B:pH	4,86667	0,818978	1,0
C:Aceite/Etanol ratio	9,31111	0,668693	1,0
AA	-0,0833333	1,41851	1,0
AB	-1,925	1,00304	1,0
AC	0,3	0,818978	1,0
BB	1,46667	1,41851	1,0
BC	0,383333	0,818978	1,0
Bloque	-0,311111	0,668693	1,0

Errores estándar basados en el error total con 26 g.l.

Tabla 3.46. Análisis de Varianza (ANOVA) para la variable contenido en FAEE.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Temperatura	11,2067	1	11,2067	2,78	0,1072
B:pH	142,107	1	142,107	35,31	0,0000
C:Aceite/Etanol ratio	780,271	1	780,271	193,89	0,0000
AA	0,0138889	1	0,0138889	0,00	0,9536
AB	14,8225	1	14,8225	3,68	0,0660
AC	0,54	1	0,54	0,13	0,7171
BB	4,30222	1	4,30222	1,07	0,3107
BC	0,881667	1	0,881667	0,22	0,6436
Bloques	0,871111	1	0,871111	0,22	0,6456
Error total	104,633	26	4,02435		
Total (corr.)	1059,65	35			

R² = 90,1257 %

R² (ajustada por g.l.) = 87,2 %

Error estándar del estimado = 2,00608 %

Error absoluto medio = 1,30895 %

Tabla 3.47. Coeficientes de regresión para la variable contenido en FAEE.

Coeficiente	Estimado
Constante	38,2944
A:Temperatura	-0,683333
B:pH	2,43333
C:Aceite/Etanol ratio	4,65556
AA	-0,0416667
AB	-0,9625
AC	0,15
BB	0,733333
BC	0,191667

La ecuación del modelo ajustado es:

$$\mathbf{FAEE = 38,29 - 0,68*T + 2,43*pH + 4,65*R - 0,04*T^2 - 0,96*T*pH + 0,15*T*R + 0,73*pH^2 + 0,19*pH*R}$$

siendo:

T; Temperatura

pH; pH

R; Aceite/Etanol v/v ratio

En la **Tabla 3.48**, se pueden observar los resultados alcanzados al introducir las variables utilizadas en cada experimento en la ecuación que describe al modelo anteriormente propuesto, así como el resultado experimental obtenido, pudiéndose comparar ambos alcanzando una idea clara de cómo el modelo explica la observación experimental.

Como se puede ver en la **Figura 3.46**, donde las variables que tienen un efecto significativo en el contenido en FAEE (valor $P < 0.05$) están marcadas en cursiva, no todas las variables tenidas en cuenta en el análisis de los datos tienen un efecto estadísticamente significativo en la variable de salida contenido en FAEE. Es por ello, por lo que en este caso, como en el anterior referido a la variable de salida conversión, se puede rehacer el modelo eliminando las variables que no ejercen un efecto significativo en el contenido

en FAEE, simplificando de esta forma el modelo que describe al sistema estudiado. En consecuencia, se han eliminado del modelo inicial todas las interacciones de segundo orden entre las variables, excepto pH y la relación aceite/etanol. De esta forma se obtiene un nuevo modelo más simplificado, como se muestra en las **Tablas 3.49 a 3.51**.

Tabla 3.48. Resultados Estimados para la variable contenido en FAEE.

Fila	Valores Observados	Valores Ajustados
1	43,5	43,5972
2	31,9	32,3736
3	43,5	43,1056
4	42,1	44,9264
5	47,6	47,9181
6	39,6	36,7694
7	40,6	40,7431
8	34,8	34,9319
9	32,4	32,9194
10	36,2	38,5236
11	43,8	42,5306
12	32,6	32,2861
13	32,4	33,7944
14	38,5	41,2139
15	49,7	46,4639
16	32,6	32,1153
17	43,7	41,6014
18	34,9	34,5861
19	31,5	32,6083
20	40,7	42,7944
21	31,9	31,975
22	35,3	34,275
23	34,5	34,6208
24	35,7	38,2125
25	43,1	41,2903
26	32,6	31,8042
27	43,8	42,2194
28	46,9	46,1528
29	42,2	40,4319
30	47,3	47,6069
31	32,8	33,4833
32	42,9	44,6153
33	32,2	32,0625
34	39,9	36,4583
35	36,9	40,9028
36	44,6	43,2861

Tabla 3.49. Efectos estimados para la variable contenido en FAEE.

Efecto	Estimado	Error Estándar	V.I.F.
Promedio	38,7556	0,344097	
B:pH	4,86667	0,842862	1,0
C: Aceite/Etanol ratio	9,31111	0,688194	1,0
Bloque	-0,311111	0,688194	1,0

Errores estándar basados en el error total con 30 g.l.

Tabla 3.50. Análisis de Varianza (ANOVA) para la variable contenido en FAEE.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
B:pH	142,107	1	142,107	33,34	0,0000
C: Aceite/Etanol ratio	780,271	1	780,271	183,05	0,0000
Bloques	0,871111	1	0,871111	0,20	0,6543
Error total	136,4	32	4,2625		
Total (corr.)	1059,65	35			

R² = 87,1278 %

R² (ajustada por g.l.) = 86,3477 %

Error estándar del estimado = 2,06458 %

Error absoluto medio = 1,59444 %

Tabla 3.51. Coeficientes de regresión para la variable contenido en FAEE.

Coefficiente	Estimado
Constante	38.7556
B:pH	2.43333
C: Aceite/Etanol ratio	4.65556

La ecuación simplificada del nuevo modelo ajustado es:

$$\text{FAEE} = 38.75 + 2.43 \cdot \text{pH} + 4.65 \cdot \text{R}$$

siendo:

T; Temperatura

pH; pH

R; Aceite/Etanol v/v ratio

Puede observarse como eliminando del modelo las variables no significativas, el sistema queda descrito por una ecuación mucho más simple y sigue explicando más del 87 % de la variabilidad en contenido en FAEE.

3.3.1.4.3

RESULTADOS PARA LA VISCOSIDAD CINEMÁTICA

Se ha intentado llevar a cabo un ajuste matemático para la variable de salida viscosidad cinemática para la enzima LR, pero no ha sido posible, ya que como se muestra a continuación, en la **Tabla 3.52**, no existe significación estadística suficiente que indique correlación de algún tipo entre las variables de reacción estudiadas y la viscosidad cinemática.

Tabla 3.52. Análisis de Varianza (ANOVA) para la variable Viscosidad cinemática.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Temperatura	3,30042	1	3,30042	0,76	0,3919
B:pH	0,881667	1	0,881667	0,20	0,6564
C:Aceite/Etanol ratio	6,16694	1	6,16694	1,42	0,2447
AA	7,54014	1	7,54014	1,73	0,1997
AB	45,2256	1	45,2256	10,39	0,0034
AC	3,60375	1	3,60375	0,83	0,3713
BB	6,96889	1	6,96889	1,60	0,2170
BC	2,94	1	2,94	0,68	0,4187
bloques	0,0469444	1	0,0469444	0,01	0,9181
Error total	113,202	26	4,35392		
Total (corr.)	189,876	35			

R² = 40,3812 %

R² (ajustada por g.l.) = 22,7164 %

Error estándar del estimado = 2,08661 %

Error absoluto medio = 1,55941 %

3.3.2

EXPERIMENTOS DE VALIDACIÓN DE LOS MODELOS

Para validar los modelos propuestos, se han llevado a cabo una serie de tres experimentos, cuyas condiciones de reacción han sido seleccionadas de entre el rango de estudio de las variables.

Para ello, en la **Tabla 3.53**, se muestran las condiciones de reacción y los datos de conversión, contenido en FAEE y viscosidad cinemática para cada experimento llevado a cabo. Se muestran tanto los valores experimentales obtenidos como los teóricos proporcionados por los modelos simplificados.

Tabla 3.53. Experimentos de validación de los modelos simplificados para la enzima Biolipasa R.

Temperatura (°C)	pH	Aceite/Etanol ratio	Conversión (%)		FAEE (%)	
			Exp.	Ajust.	Exp.	Ajust.
25	11.5	12/2.9	68.8	72.7	39.5	41.5
30	10.5	12/2.75	63.7	66.8	42.3	39.4
50	9	12/3.3	70.9	68.1	44.7	40.9

3.3.3

INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA

Finalmente, para tener datos más precisos de la temperatura, se han llevado a cabo una serie de experimentos, en las condiciones óptimas anteriormente obtenidas, pero haciendo ahora un barrido más amplio de temperatura. De esta forma queremos cerciorarnos de que realmente la enzima no presenta un máximo de actividad enmascarado en la zona de estudio y que presenta realmente una relación prácticamente lineal.

Los datos de estos experimentos se muestran en la **Tabla 3.54**.

Tabla 3.54. Influencia de la temperatura en la actividad enzimática de la lipasa LR en el rango de temperaturas entre 20 y 60 °C.

Temp. (°C)	Conversión (%)	FAEE (%)	MG+DG (%)	TG (%)	Viscosidad (mm ² /s)	Peso Lipasa (mg)
20	80.2	58.7	21.5	19.8	8.3	5.5
30	75.1	53.3	21.8	24.9	8.7	5.7
40	66.7	48.9	20.8	33.3	9.1	5.6
50	64.9	44.6	20.3	35.1	8.9	5.5
60	58.3	38.7	19.6	41.7	9.0	5.7

Como puede verse en la **Tabla 3.54**, se produce un descenso prácticamente lineal en la conversión al aumentar la temperatura de reacción, obteniéndose mayores conversiones y menores viscosidades a bajas temperaturas.

IV

DISCUSIÓN: LIPASAS EN FORMA LIBRE

4.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS: LIPASAS EN FORMA LIBRE

4.1

LIPASA PANCREÁTICA DE CERDO (PPL)

En este apartado se lleva a cabo una discusión de los resultados obtenidos del análisis de la influencia de diferentes parámetros de reacción en la actividad de la PPL en forma libre.

En a **Figura 4.1**, se puede ver un gráfico que muestra como afectan las proporciones relativas (volumétricas) aceite/etanol al desarrollo de la reacción de transesterificación.

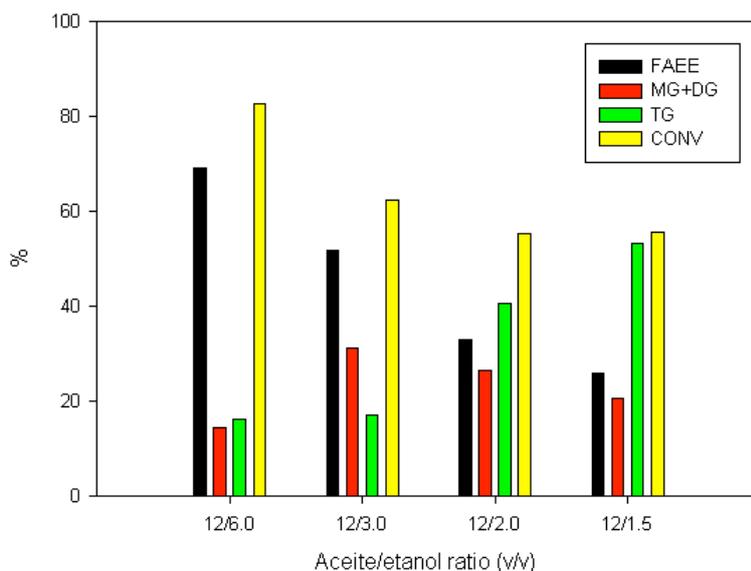


Figura 4.1. Gráfico de conversión para diferentes relaciones volumétricas aceite/etanol.

Se puede observar claramente como a medida que aumenta la relación aceite/etanol, o sea, a medida que disminuye la cantidad de etanol presente para una misma cantidad de aceite, se produce un descenso de la conversión así como del contenido en FAEE de la mezcla final. Esto está de acuerdo con los resultados reportados para la mayoría de lipasas utilizadas en reacciones de transesterificación con aceites y alcoholes de cadena corta [171, 172]. También se puede observar que no existe este mismo comportamiento para el contenido de monoglicéridos y diglicéridos, que aumentan hasta una relación volumétrica 12/3, que se corresponde con una relación molar 1/5.1, elevando la viscosidad de la mezcla final.

En las siguientes condiciones de reacción (relación molar aceite/etanol 1/10.3, 40 °C, 0.01 g PPL, pH 12 y 30 minutos de reacción) se consiguen conversiones cercanas al 100 % con contenidos de MG y DG de entre 14 - 18 %, de los cuales la mayoría son MG. Se obtienen también viscosidades del orden de 6 cSt, lo que posibilitaría la utilización de este combustible en motores diesel sin necesidad de ser mezclado con diesel de origen fósil para ajustar la viscosidad [1, 164, 174].

Este comportamiento podría ser debido al aumento de la eficiencia difusional del sistema al aumentar las cantidades de etanol presentes en el medio, además de por la estequiometría y cinética de la reacción, que hacen que un exceso de etanol beneficie el desplazamiento del equilibrio hacia la formación de FAEE.

En los estudios anteriores realizados por nuestro grupo [22, 23, 90, 141], se emplearon tiempos de reacción muy variables, pero los resultados obtenidos inducían a pensar que la mayor parte de la conversión se llevaba a cabo en tiempos realmente muy cortos; así se ha considerado la necesidad de evaluar con más exactitud este comportamiento.

Es interesante destacar el hecho de que se alcanza la máxima cantidad teórica posible de FAEE (~66% teniendo en cuenta el carácter 1,3-selectivo de la PPL) a tiempos muy cortos de reacción, sobre 3-5 minutos [23]. El porcentaje adicional de rendimiento en FAEE, obtenido a tiempos más

largos, puede ser atribuido a un proceso paralelo de 1,2-acilmigración experimentado por los monoglicéridos, y favorecido a su vez por el medio de reacción alcalino [157, 175 - 179].

En la **Figura 4.2** se puede ver la relación existente entre la cantidad de lipasa empleada y la conversión.

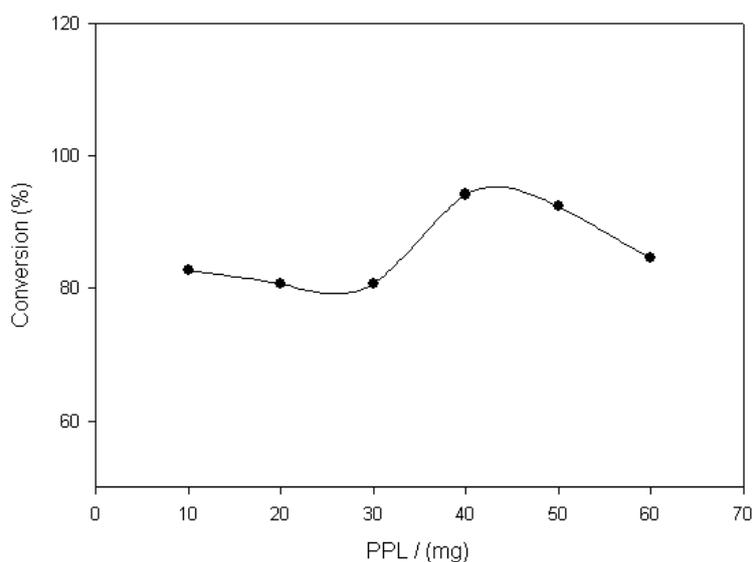


Figura 4.2. Gráfico de conversión para cantidades crecientes de PPL en el medio de reacción. Condiciones de reacción: pH 12, 40 °C, 1 hora de reacción y relación volumétrica aceite/etanol 2/1.

Se aprecia un aumento tanto en la conversión como en el rendimiento en FAEE hasta los 40 mg de PPL añadidos, a partir de los cuales, el aumento sucesivo en la cantidad de enzima añadida produce un efecto negativo, ocasionando una caída de la conversión del sistema. Este descenso se debe con casi toda seguridad a una deficiente homogeneización del sistema, teniendo en cuenta que se trata de un medio de elevada viscosidad que facilita la formación de agregados enzimáticos, lo cual impide que muchas de las biomoléculas tengan sus sitios activos disponibles para el acceso de los sustratos de la reacción.

En cuanto a la temperatura de reacción, en la **Figura 4.3**, se observa como usando condiciones óptimas de reacción, (pH 12, relación volumétrica aceite/etanol 2/1, 40 mg de PPL y 1 hora de reacción), se obtiene un moderado descenso de la conversión y del rendimiento en FAEE al aumentar la temperatura desde 40 hasta 60 °C, por lo que se considera la temperatura óptima a 40 °C, lo cual contrasta con las observaciones previas realizadas por Caballero y Luna [23], donde la temperatura óptima era 60 °C. Se pone así de manifiesto que la temperatura es un parámetro clave y dependiente del resto de las condiciones de reacción. Probablemente, la temperatura de reacción se vea severamente influenciada por el contenido en agua del sistema, ya que al tratarse de sistemas orgánicos, no acuosos, el agua presenta un papel fundamental en la inestabilidad y consiguiente desactivación de las lipasas en disolventes anhidros. De hecho, está reportado como las lipasas en disolventes orgánicos anhidros presentan una gran estabilidad térmica, la cual comienza a descender bruscamente cuando en ese mismo sistema se aumenta levemente la cantidad de agua presente. Este comportamiento parece deberse a que el agua en los disolventes orgánicos provoca cambios conformacionales en las enzimas y posibilita, actuando como “lubricante”, los cambios de conformación que conducen a su inactivación.

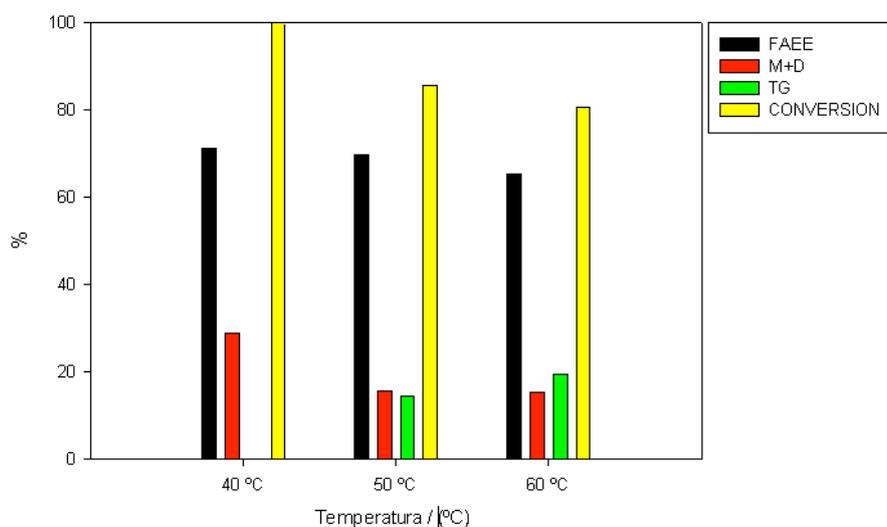


Figura 4.3. Gráfico de conversión y rendimiento frente a la temperatura en condiciones óptimas de reacción. Condiciones de reacción: pH 12, 1 hora de reacción, 40 mg PPL, relación aceite/etanol 2/1 y 40 °C.

Este comportamiento está de acuerdo con lo observado en la **Figura 4.4**, donde se muestran gráficamente los datos de conversión obtenidos frente al contenido de agua presente en el medio de reacción. Se puede ver claramente como a medida que el contenido de agua va aumentando, se produce un descenso brusco de la conversión, lo cual es explicable y está de acuerdo con las observaciones previas de estabilidad térmica en comparación con los resultados previamente mostrados por Caballero y Luna [23].

En este caso, con tan solo un 0.3 % de agua añadido al medio de reacción, se observa un descenso apreciable de la actividad enzimática, que se hace mucho más acusado con la presencia de un 0.6 % de agua en el medio. Por tanto, se puede concluir que el agua es un parámetro esencial para la actividad enzimática de esta lipasa, ya que ésta realiza su función en la interfase agua/aceite, pero es necesaria tan solo una pequeña cantidad de agua, probablemente la que contiene el aceite utilizado, para cumplir sus requerimientos. A partir de aquí, si se aumenta el contenido en agua del medio, parece entrar en juego el proceso de desactivación enzimática anteriormente descrito, actuando el agua como “lubricante” permitiendo los cambios conformacionales necesarios para desactivar a la enzima.

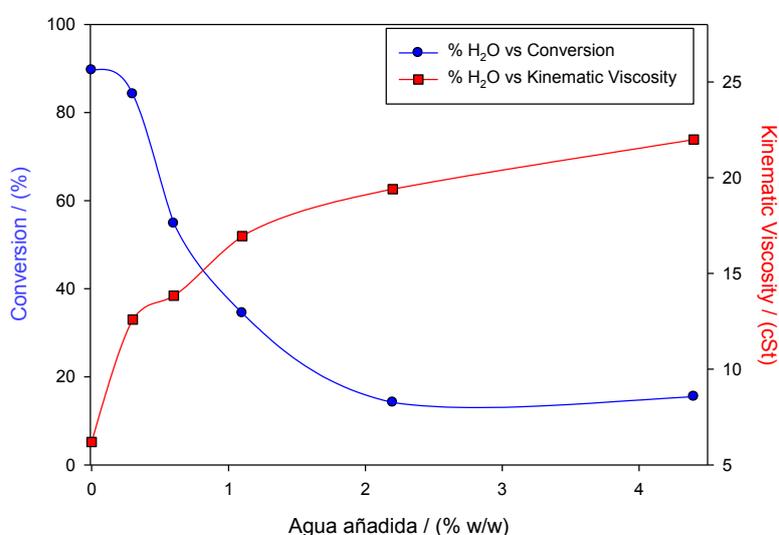


Figura 4.4. Gráfico de conversión y viscosidad cinemática obtenidos al realizar varios experimentos con diferentes contenidos de agua. Las condiciones de reacción fueron pH 12, 40 °C, 1 hora de reacción, 10 mg de PPL y relación volumétrica aceite/etanol 2/1.

Parece lógico pensar que pueda existir un efecto conjunto debido al contenido de agua en el medio de reacción, pero también de la fuerza iónica del medio, o sea, el contenido salino, ya que suele ser un parámetro que juega un papel fundamental en la estabilidad de la estructura de las proteínas. A fin de evaluar si realmente existe influencia de estos parámetros, incluso si el efecto positivo observado a altos valores de pH es realmente debido al pH o al aumento de la concentración salina, o incluso debido a un efecto conjunto, se realizaron varios experimentos en los que, para distintas relaciones volumétricas aceite/etanol, se usan volúmenes constantes (0.1 ml) de disoluciones de NaOH en concentraciones comprendidas entre 1 - 10 M. De esta manera, se consiguen diferentes pH y diferentes concentraciones salinas en el medio de reacción. Los resultados se muestran en la **Figura 4.5**.

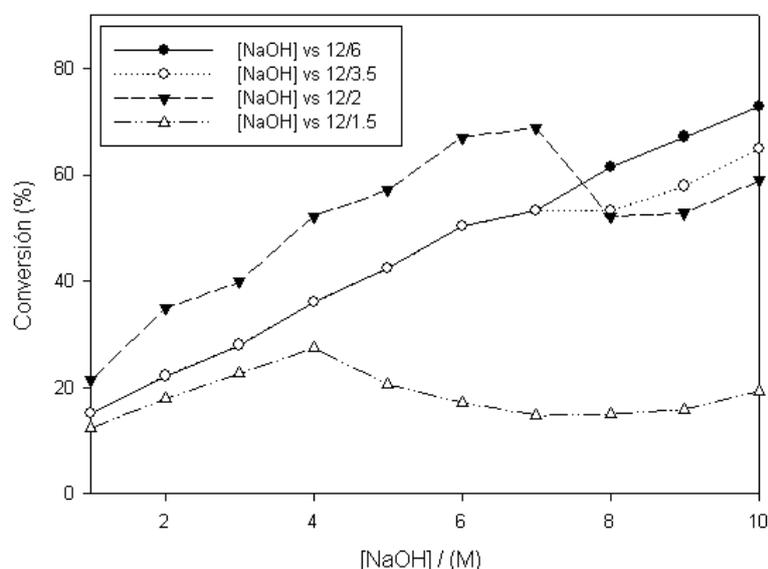


Figura 4.5. Gráfico de conversiones usando volúmenes constantes (0.1 ml) de disolución de NaOH con concentraciones entre 1 - 10 M. Se han llevado a cabo las reacciones con diferentes relaciones aceite/etanol y variando la concentración de NaOH utilizada.

De la **Figura 4.5**, se pueden extraer a primera vista varias conclusiones. En primer lugar, se observa claramente como con la relación volumétrica aceite/etanol 12/1.5 se obtienen las menores conversiones para

todas las concentraciones de NaOH utilizadas, lo cual está de acuerdo con la reacción estequiométrica, ya que en este caso no se alcanza la cantidad estequiométrica necesaria de etanol. En segundo lugar, también puede verse que con la concentración 10 M, que es la que se ha utilizado en todos los experimentos anteriores realizados con esta enzima, existe un aumento de la conversión al aumentar la cantidad de etanol presente en el medio de reacción, lo que puede observarse también en la **Figura 4.1** anteriormente citada. Este comportamiento se modifica y no sigue la secuencia de aumento de conversión al aumentar la cantidad de etanol al disminuir la concentración del NaOH utilizado, de forma que, para una concentración de NaOH 7M, la relación aceite/etanol es la que consigue mayor conversión.

También puede observarse que para las dos relaciones volumétricas mayores, 12/3.5 y 12/6, que suponen un exceso de etanol en el medio, se produce un solapamiento perfecto en la conversión hasta valores de concentración de hidróxido sódico de 7M, a partir de aquí, la relación 12/6 que comporta un mayor exceso de etanol, es la que rinde mayores conversiones.

En definitiva, de la información extraída de esta **Figura 4.5**, se puede concluir que existe un efecto conjunto entre la concentración de NaOH utilizada, y por tanto la cantidad de agua, y el contenido de etanol del medio de reacción, lo que probablemente esté relacionado con la concentración salina efectiva existente en el medio, de modo que se produce un máximo de conversión para valores óptimos de este parámetro. De hecho, existen zonas, en las que simplemente modificando la concentración de NaOH utilizada, se pueden obtener los mismos resultados para diferentes relaciones aceite/etanol.

Este es el primer reporte que se hace sobre esta dependencia de las lipasas en la producción de biocombustible, de modo que siempre se tiende a estudiar la influencia del pH y de las relaciones aceite/alcohol. Esta observación puede ser de gran utilidad en la optimización de las condiciones de reacción de la PPL en la reacción de transesterificación, así como de otras

lipasas. Este comportamiento ha sido publicado debido a su interés y novedad [141].

4.2

BIOLIPASA R (LR)

En este punto se hace una discusión de los resultados obtenidos al evaluar la influencia de los parámetros de reacción en la reacción de transesterificación llevada a cabo con la lipasa comercial *Biolipasa R* en forma libre.

Los resultados presentados en el capítulo correspondiente a los resultados de la *Biolipasa R* son resumidos y discutidos a continuación.

Inicialmente, y dada la importancia de este parámetro en la actividad de las lipasas, se ha evaluado la influencia del contenido de agua en la conversión. Los resultados se muestran gráficamente en la **Figura 4.6**.

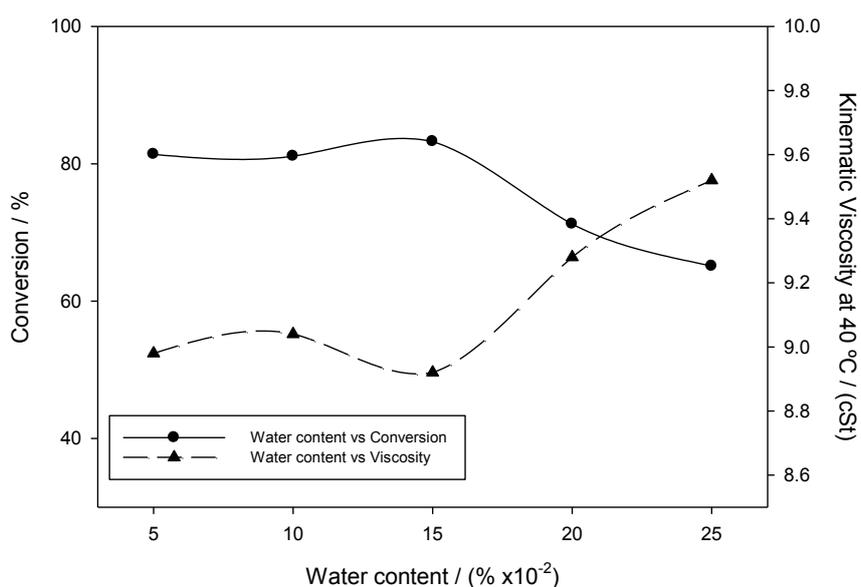


Figura 4.6. Gráfico mostrando la influencia de la cantidad de agua presente en el medio de reacción en la conversión y la viscosidad.

Se observa un máximo de conversión y mínimo en la viscosidad cinemática para contenidos de agua en el medio del 0.15 %, por lo que este parámetro ha sido fijado para el resto de reacciones llevadas a cabo con esta enzima en el valor indicado.

Posteriormente se ha evaluado la influencia de la cantidad de enzima utilizada para llevar a cabo las reacciones de transesterificación. Los resultados se muestran en la **Figura 4.7**.

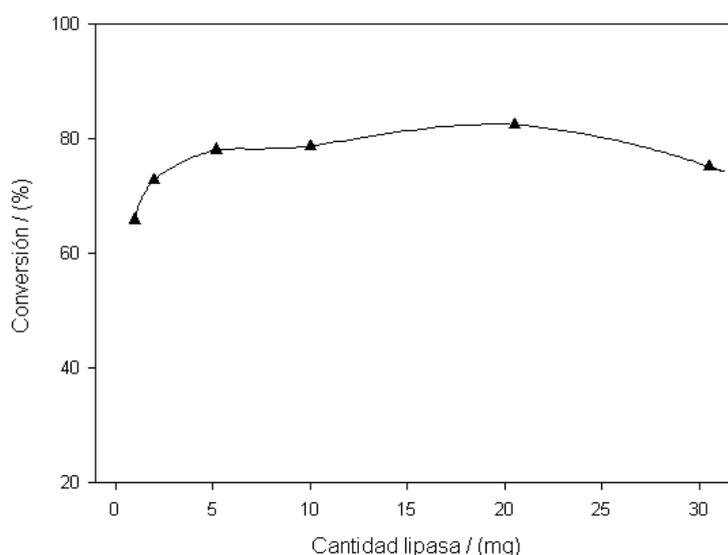


Figura 4.7. Gráfico mostrando la influencia en la conversión de la cantidad de lipasa presente en el medio de reacción.

Para esta lipasa se ha encontrado una relación de aumento continua de la conversión al aumentar la cantidad de lipasa añadida al medio, hasta aproximadamente 20 mg de lipasa; a partir de aquí se observa un leve descenso en la conversión, probablemente debido a los efectos de aglomeración enzimática ya descritos para otras lipasas en forma libre. Por ello, fijamos para los siguientes experimentos como cantidad óptima de catalizador a utilizar de 20 mg.

Una vez fijados los contenidos de agua y de lipasa en el medio de reacción, se ha realizado un estudio de la influencia de la temperatura, pH y relación aceite/etanol en la conversión, contenido en FAEE y viscosidad cinemática, no encontrándose correlación alguna para esta última variable de salida, por considerarse estos tres parámetros los que más interacciones pueden presentar entre sí.

En la **Figura 4.8**, se presenta el diagrama de Pareto, en el cual se puede observar claramente cuáles son los factores que influyen de manera estadísticamente significativa en la conversión. En este caso, la variable más influyente es la relación aceite/etanol, seguida del pH y de la temperatura, en orden decreciente de importancia. Es de destacar que tanto la relación aceite/etanol como el pH tienen una influencia positiva, de modo que al aumentar estas magnitudes se produce un aumento en la conversión.

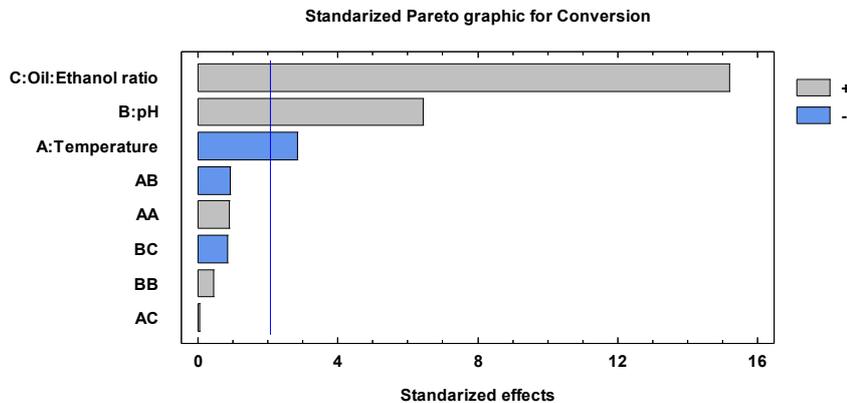


Figura 4.8. Gráfico de Pareto para la variable de salida conversión.

Pueden también observarse en la **Figura 4.9**, los efectos principales. En este gráfico se deduce fácilmente como una pendiente positiva indica un efecto positivo en la conversión, así como un mayor valor de la pendiente indica un efecto más acusado y viceversa. Por tanto se observa aquí y de manera complementaria a la **Figura 4.8**, como la relación aceite/etanol es el parámetro con mayor significancia estadística en la conversión.

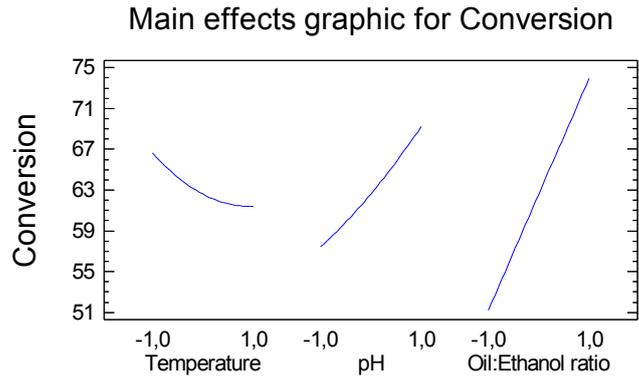


Figura 4.9. Gráfico de efectos principales para la variable de salida conversión.

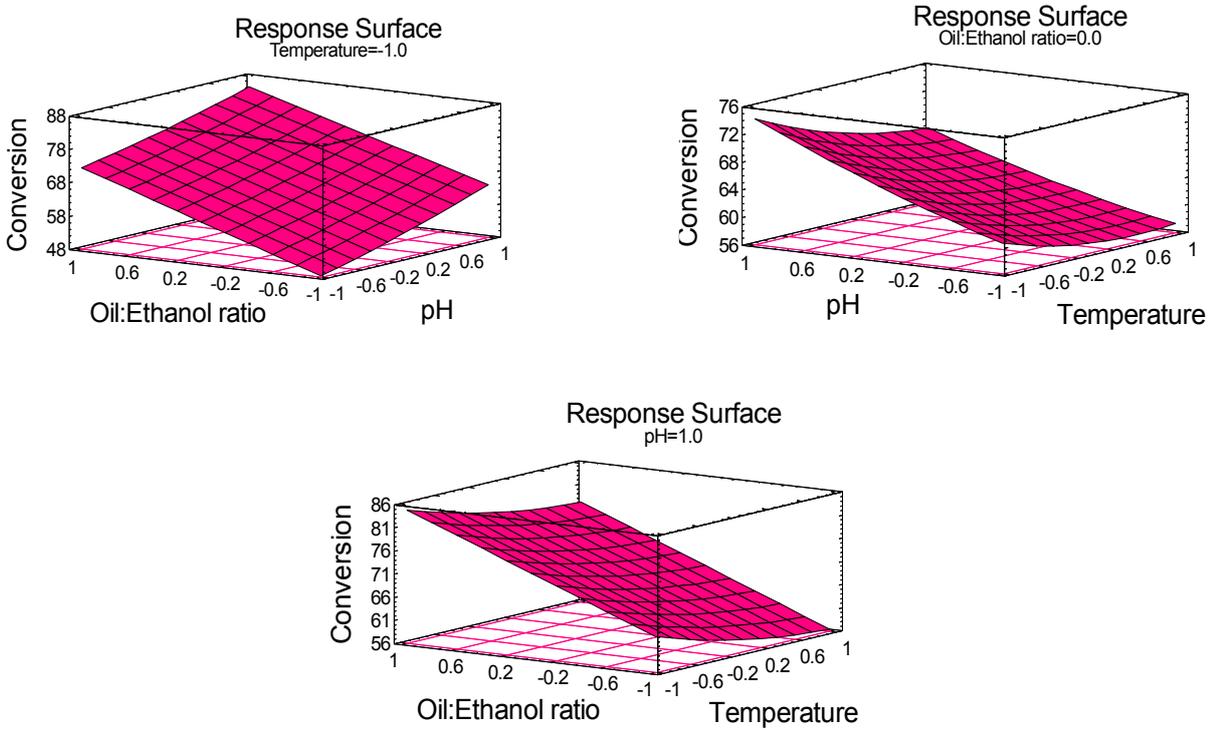


Figura 4.10. Superficies de respuesta para la variable de salida conversión.

En la **Figura 4.10**, se muestran las superficies de respuesta obtenidas para el modelo estadístico creado para el sistema en estudio y para la variable de salida conversión. El ajuste del modelo es bueno, con unos valores de R^2 del 91.6 %, lo cual indica una buena correlación entre los valores experimentales y predichos por el modelo creado, como puede verse en la **Figura 4.11**.

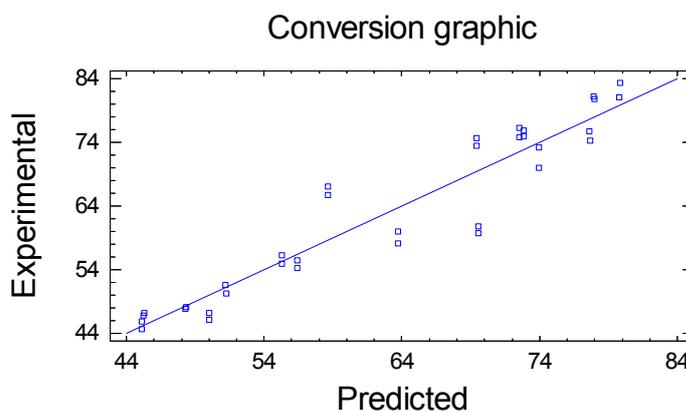


Figura 4.11. Gráfico de correlación entre valores experimentales y predichos por el modelo estadístico para la variable de salida conversión.

La ecuación del modelo ajustado que se obtiene es la siguiente:

$$\text{Conversión} = 62,59 - 2,60 \cdot T + 5,90 \cdot \text{pH} + 11,36 \cdot R + 1,43 \cdot T^2 - 1,03 \cdot T \cdot \text{pH} + 0,03 \cdot T \cdot R + 0,72 \cdot \text{pH}^2 - 0,77 \cdot \text{pH} \cdot R$$

Se podría rehacer el modelo estadístico propuesto si se eliminan de este las variables sin significación estadística en un intervalo de confianza del 95 %; de esta manera se simplifica el proceso y éste sigue explicando el 90.7 % de la variación en la conversión. Eliminando las variables estadísticamente no significativas, el modelo obtenido se simplifica sustancialmente, de modo que ahora solo entran en juego la relación aceite/etanol, pH y temperatura,

sin tener en cuenta las relaciones de segundo orden existentes entre estas tres variables. En la **Figura 4.12** se muestra el gráfico de efectos principales donde, como es lógico, ahora se observan líneas totalmente rectas, debido a que se han eliminado del modelo las variables con una dependencia de segundo orden, quedando el modelo limitado a una relación puramente lineal.

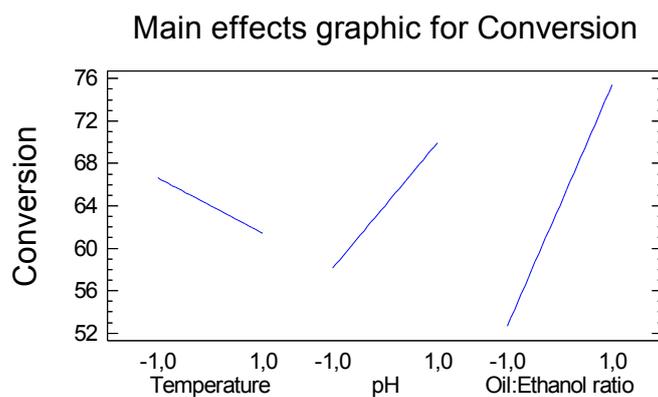


Figura 4.12. Gráfico de efectos principales para el modelo simplificado y para la variable de salida conversión.

En la **Figura 4.13** se muestran las nuevas superficies de respuesta obtenidas, que también ponen de manifiesto que ahora el modelo está regido por relaciones lineales entre variables.

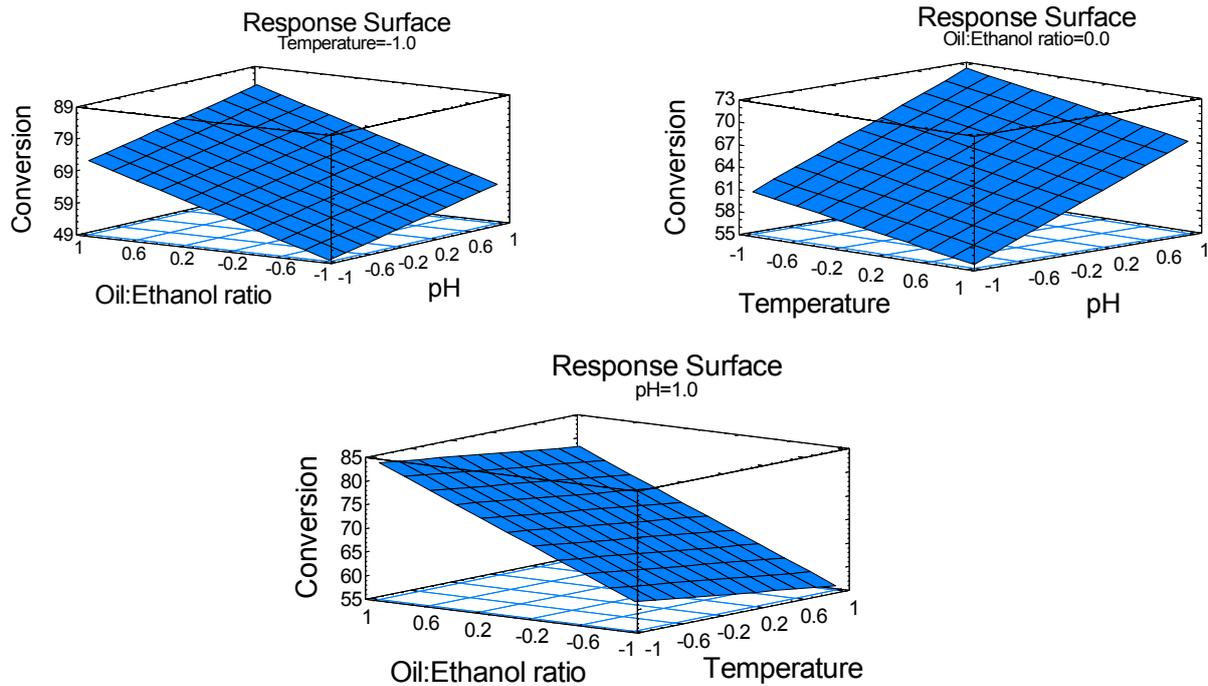


Figura 4.13. Superficies de respuesta del modelo simplificado para la variable de salida conversión.

Se puede observar como las superficies de respuesta siguen siendo muy parecidas aunque se ha perdido la ligera curvatura de las mostradas en la **Figura 4.10**, ya que ahora el modelo es puramente lineal. Además, se observa que se mantiene el R^2 prácticamente sin variar e incluso se produce una mejora en el error estándar del estimado, que pasa de 4.48 a 4.30.

Por todo ello, y dado que se sigue explicando el 90.7 % de la variabilidad en la conversión, como se observa en la **Figura 4.14**, puede utilizarse el modelo simplificado para describir el sistema, quedando la ecuación que lo describe como:

$$\text{Conversión (\%)} = 64,03 - 2,60 \cdot T + 5,90 \cdot \text{pH} + 11,36 \cdot R$$

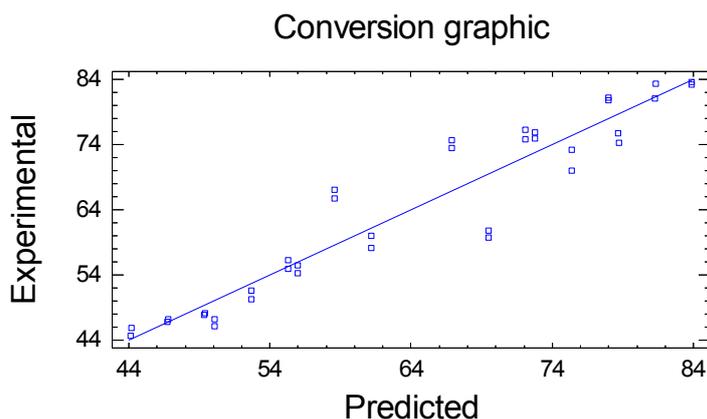


Figura 4.14. Gráfico de correlación entre valores experimentales y predichos por el modelo estadístico simplificado para la variable de salida conversión.

Por tanto, puede concluirse que el modelo creado para correlacionar las variables de reacción con la conversión es aceptable y explica la variabilidad producida en la conversión.

También se ha realizado un estudio de la influencia de la temperatura, pH y relación aceite/etanol en el contenido en FAEE de la mezcla final de reacción. Los resultados y discusión de estos se resumen a continuación.

En la **Figura 4.15** se muestra el diagrama de Pareto para la variable de salida contenido en FAEE. En este diagrama se observa que la relación aceite/etanol y el pH son, en orden decreciente de importancia, los factores estadísticamente significativos en el contenido en FAEE. En este caso, la temperatura no es un factor influyente para un nivel estadístico de confianza del 95 %. Puede también observarse como la variable mayoritariamente influyente y de forma positiva es la relación aceite/etanol. Por tanto, un aumento de la relación aceite/etanol y del pH en el rango de estudio, producen un aumento en el contenido en FAEE de la mezcla final.

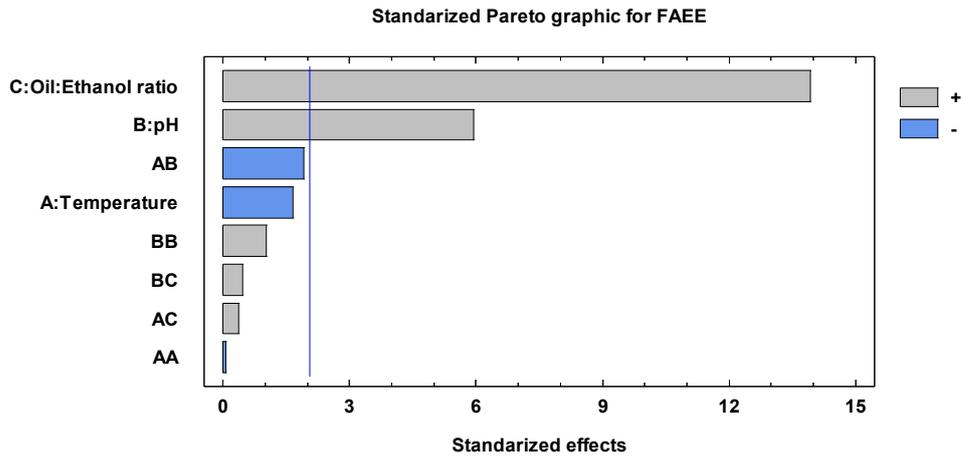


Figura 4.15. Gráfico de Pareto para la variable de salida contenido en FAEE.

De la misma forma, en la **Figura 4.16**, se muestra el gráfico de efectos principales para la variable de salida contenido en FAEE. Se observa en esta figura como tanto el pH como la relación aceite/etanol producen un efecto positivo en el contenido en FAEE de la mezcla final de reacción. Además, se puede ver como este efecto para estas dos variables es bastante acusado, como puede deducirse de las grandes pendientes positivas mostradas para ambos efectos. En cambio, tal como se podía ver en el anterior diagrama de Pareto, y como también puede deducirse de la figura de efectos principales, el efecto provocado por la temperatura en el contenido en FAEE es negativo y mucho menos acusado, tal como puede deducirse de la leve pendiente negativa.

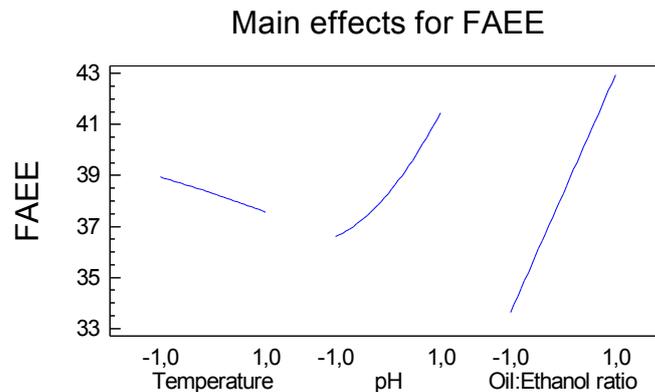


Figura 4.16. Gráfico de efectos principales para la variable de salida conversión.

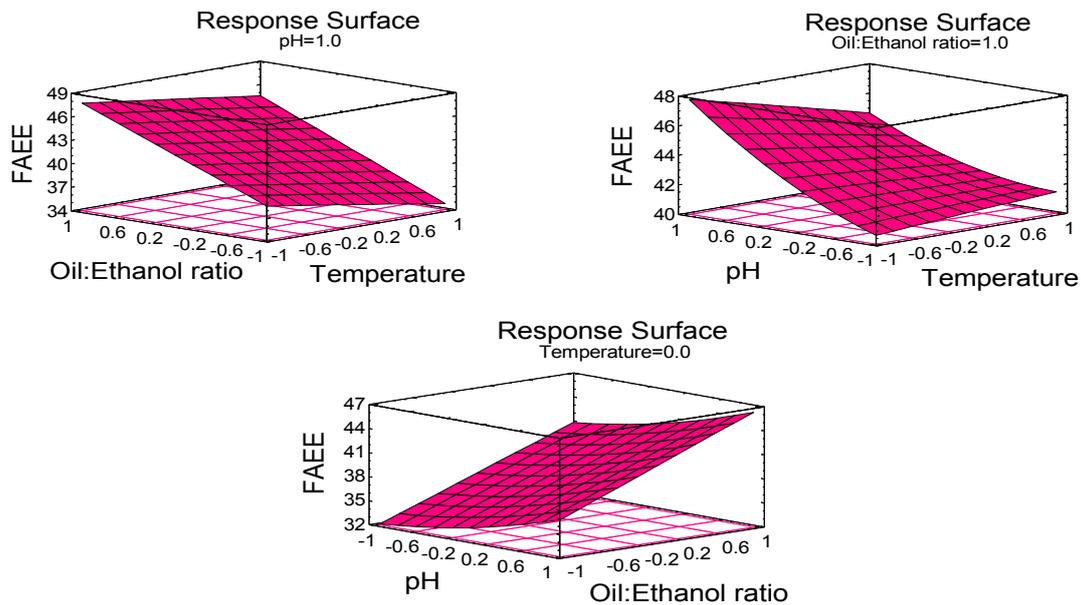


Figura 4.17. Superficies de respuesta para la variable de salida contenido en FAEE.

En la **Figura 4.17** se muestran las superficies de respuesta obtenidas para el modelo estadístico y la variable de salida contenido en FAEE. El modelo proporciona un buen ajuste, como se desprende del valor de R^2 de 90.1 %, lo cual es bastante bueno para tratarse de un sistema enzimático y relativamente complejo. Este valor de R^2 indica una buena correlación entre los valores experimentales y los proporcionados por la ecuación modelada, lo cual puede verse gráficamente en la **Figura 4.18**.

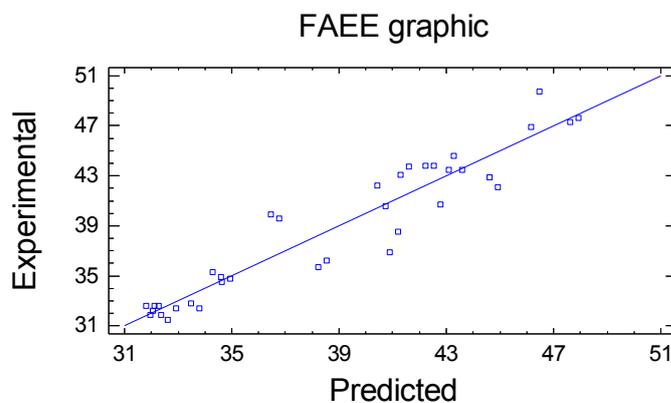


Figura 4.18. Gráfico de correlación entre valores experimentales y predichos por el modelo estadístico simplificado para la variable de salida conversión.

La ecuación resultante del modelo así ajustado se muestra a continuación:

$$\text{FAEE (\%)} = 38,29 - 0,63*T + 2,43*pH + 4,66*R - 0,04*T^2 - 0,96*T*pH + 0,15*T*R + 0,73*pH^2 + 0,19*pH*R$$

Al igual que en el caso de la variable de salida conversión, en éste también se pueden eliminar del modelo las variables estadísticamente no significativas, para de esa forma obtener un modelo aún más simplificado. Tras llevarlo a cabo se obtiene del nuevo análisis ANOVA con un R^2 algo menor y con un valor de 87.1 %, lo que indica un ajuste levemente menor, pero que aún sigue explicando el 87.1 % de la variabilidad para el contenido en FAEE.

Eliminando del modelo inicial las variables estadísticamente no significativas, el resultado se traduce en una simplificación sustancial del modelo. Ahora solo entran en juego las variables estadísticamente significativas, o sea, pH y relación aceite/etanol, sin tenerse en cuenta ni la temperatura ni ninguna de las relaciones de segundo orden existentes entre las variables de reacción.

En la **Figura 4.19** se observa el gráfico de efectos principales para el nuevo modelo simplificado, donde al igual que el modelo simplificado realizado para la variable de salida conversión, muestra líneas rectas debido a la eliminación de los efectos de segundo orden.

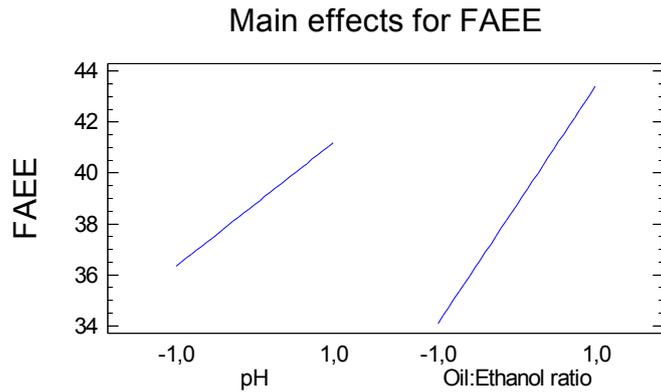


Figura 4.19. Gráfico de efectos principales para el modelo simplificado y la variable de salida contenido en FAEE.

En la **Figura 4.20** se muestra la gráfica de superficie de respuesta obtenida para el modelo simplificado y para las dos únicas variables con significación estadística, y donde también se observa como ahora el modelo está regido por relaciones lineales entre variables, ya que se obtiene un plano de superficie.

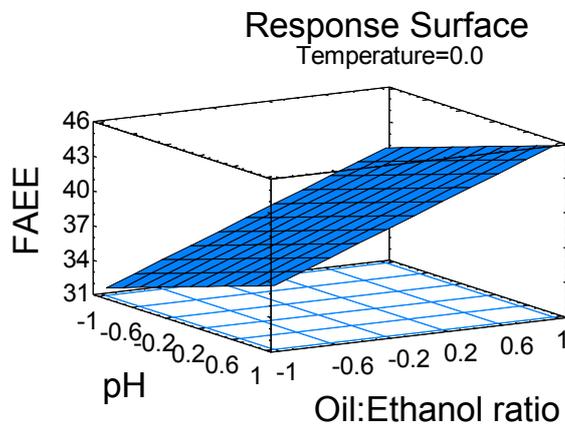


Figura 4.20. Superficie de respuesta del modelo simplificado y para la variable de salida contenido en FAEE.

En este caso y tal como se ha mencionado antes y como puede verse en la **Figura 4.21**, el modelo simplificado explica un 87.1 % de la variabilidad en el contenido en FAEE, al contrario que el modelo inicial no simplificado que explica el 90.1 %, manteniéndose los errores estándares prácticamente iguales. Por tanto no habría una gran diferencia entre usar el modelo completo o simplificado, aunque es cierto que se obtienen resultados más precisos con el modelo completo.

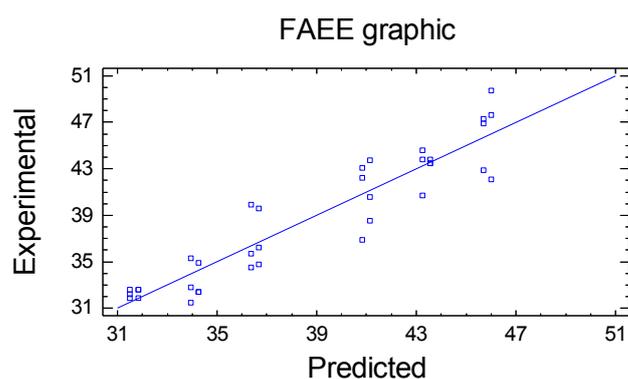


Figura 4.21. Gráfico de correlación entre valores experimentales y predichos por el modelo estadístico simplificado para la variable de salida conversión.

La ecuación del modelo simplificado queda de la siguiente manera:

$$\mathbf{FAEE = 38,76 + 2,43 \cdot pH + 4,66 \cdot R}$$

Por tanto puede concluirse, que el modelo creado para explicar la variabilidad en el contenido en FAEE, puede ser utilizado con buenos resultados para predecir el contenido en FAEE, siendo recomendable utilizar el modelo no simplificado para este caso, ya que se obtiene un mejor valor de R^2 para este modelo.

Finalmente, en la **Tabla 4.1** se muestra una tabla con los experimentos realizados para validar el modelo estadístico creado. Se puede observar como existen sólo pequeñas variaciones entre los valores experimentales y predichos, por lo que se puede concluir, tal como mostraban los datos del análisis ANOVA, que el modelo es válido.

Tabla 4.1. Experimentos de validación de los modelos simplificados para la enzima Biolipasa R.

Temperatura °C	pH	Aceite/Etanol ratio	Conversión (%)		FAEE (%)	
			Exp.	Ajust.	Exp.	Ajust.
25	11.5	12/2.9	68.8	72.7	40.5	41.5
30	10.5	12/2.75	63.7	66.8	41.3	39.4
50	9	12/3.3	70.9	68.1	42.7	40.9

4.3

LIPOPAN 50 BG (LLBG)

Al igual que lo realizado para la Biolipasa R, aquí se lleva a cabo la discusión de los resultados obtenidos en el análisis de la influencia de los parámetros de reacción en la actividad de la lipasa Lipopan 50 BG en la reacción de transesterificación de aceite de girasol con etanol.

Al igual que con la Biolipasa R, inicialmente y dada la importancia de estos parámetros de reacción, se ha evaluado la influencia del contenido en agua del medio de reacción y de la cantidad de lipasa añadida en la conversión.

En la **Figura 4.23** se puede observar gráficamente la influencia del contenido de agua en la conversión y viscosidad de la mezcla final.

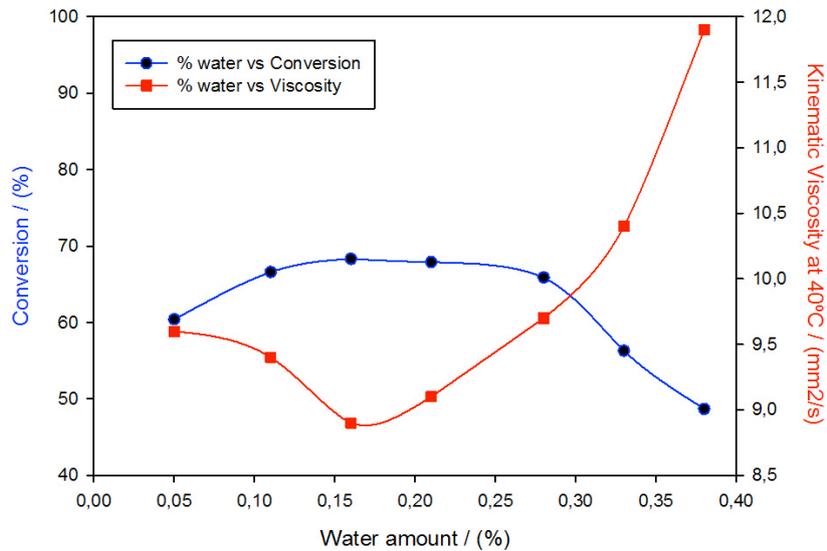


Figura 4.23. Gráfico mostrando la influencia de la cantidad de agua presente en el medio de reacción en la conversión y viscosidad.

Se puede observar un mínimo en la viscosidad que coincide con un máximo poco pronunciado en la conversión, ocurriendo esto cuando el valor del contenido en agua del medio de reacción es del 0.16 %. Como resultado de este estudio, se fija el valor del contenido en agua en un 0.16 % para el resto de experimentos llevados a cabo con la finalidad de maximizar la conversión.

Después de esto, se ha evaluado como afecta en la conversión la cantidad de lipasa utilizada. Los resultados se muestran de forma gráfica en la **Figura 4.24.**

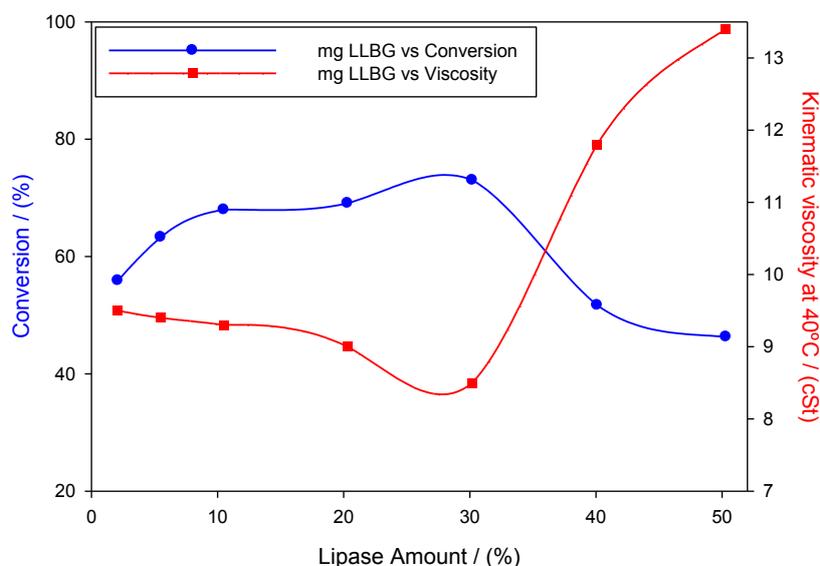


Figura 4.24. Gráfico mostrando la influencia de la cantidad de agua presente en el medio de reacción en la conversión y viscosidad.

Al igual que lo que ocurre con la Biolipasa R, en la que se observa un aumento continuo de la conversión hasta un valor de 20 mg de enzima, a partir del cual descendía la conversión, con la lipasa Lipopan 50 BG se observa un comportamiento similar con un aumento de la conversión con la cantidad de enzima utilizada hasta alcanzar un máximo con 30 mg de lipasa, a partir de los cuales se produce un descenso de la conversión mucho más pronunciado que en el caso de la Biolipasa R. Es muy posible que este descenso en la conversión a partir de los 30 mg de lipasa esté también

motivado por la aglomeración enzimática ya descrita previamente. Por tanto, se fijan las condiciones de reacción para los siguientes experimentos a un 0.16 % de agua añadida y 30 mg de lipasa.

Una vez han sido fijados el contenido en agua y la cantidad de lipasa presentes en el medio de reacción, se ha llevado a cabo una evaluación de la influencia de la temperatura, pH y relación aceite/etanol en la conversión, contenido en FAEE y viscosidad cinemática. Se ha encontrado una correlación de las variables de reacción con las variables de salida, conversión, contenido en FAEE y viscosidad cinemática, aunque en este caso la correlación es levemente más baja, tal como puede extraerse de los valores de R^2 mostrados en el apartado de resultados de esta lipasa.

En la **Figura 4.25**, se muestra el diagrama de Pareto en el que se observa de manera clara cuáles son los factores estadísticamente significantes en la conversión.

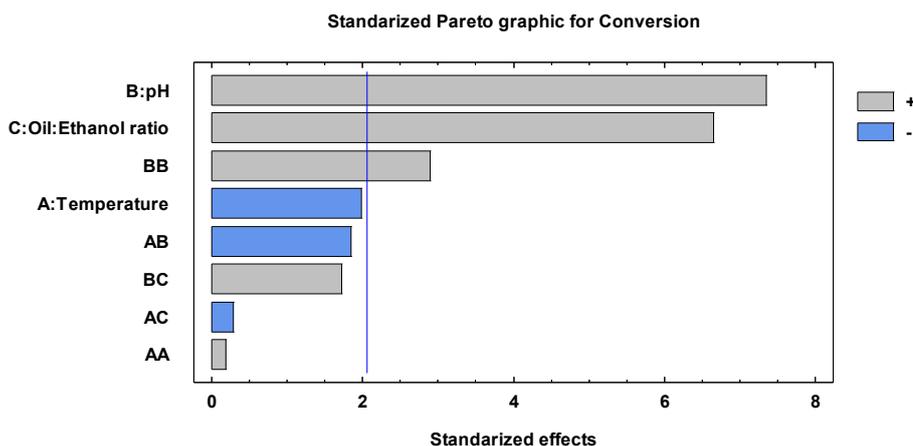


Figura 4.25. Gráfico de Pareto para la variable de salida conversión.

Como puede verse, las variables estadísticamente significantes son en este caso el pH y la relación aceite/etanol, así como la interacción de segundo orden de la variable pH (pH^2). Todas ellas influyen de manera positiva en la

conversión, de manera que un aumento de estas variables produce un aumento de la misma.

También se pueden ver en la **Figura 4.26** los efectos principales de forma gráfica, donde se comprende de manera más intuitiva como afectan cada una de las variables en la conversión. Las pendientes negativas indican un efecto negativo en la conversión y viceversa. Por tanto, se observa que el pH y la relación aceite/etanol producen un efecto positivo en la variable de salida. Además, se ve que el pH tiene mayor pendiente, lo que indica que tiene un efecto mayor sobre la conversión.

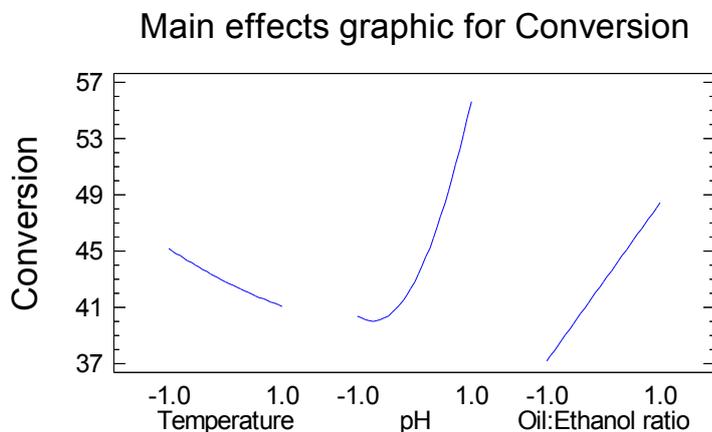


Figura 4.26. Gráfico de efectos principales para la variable de salida conversión.

En la **Figura 4.27**, se pueden ver las superficies de respuesta obtenidas en el modelo creado para la variable conversión. El valor de R^2 , que se aprecia de forma gráfica en la **Figura 4.28**, para este modelo es 81.8 %, menor que para el caso de la Biolipasa R (91.6 %). Por tanto, se puede decir que existe una buena correlación entre los valores experimentales y calculados, si bien se ha de decir que los valores de correlación se encuentran en el límite inferior de permisividad aceptables para sistemas enzimáticos, que suelen estar entorno a valores de R^2 del 80 %.

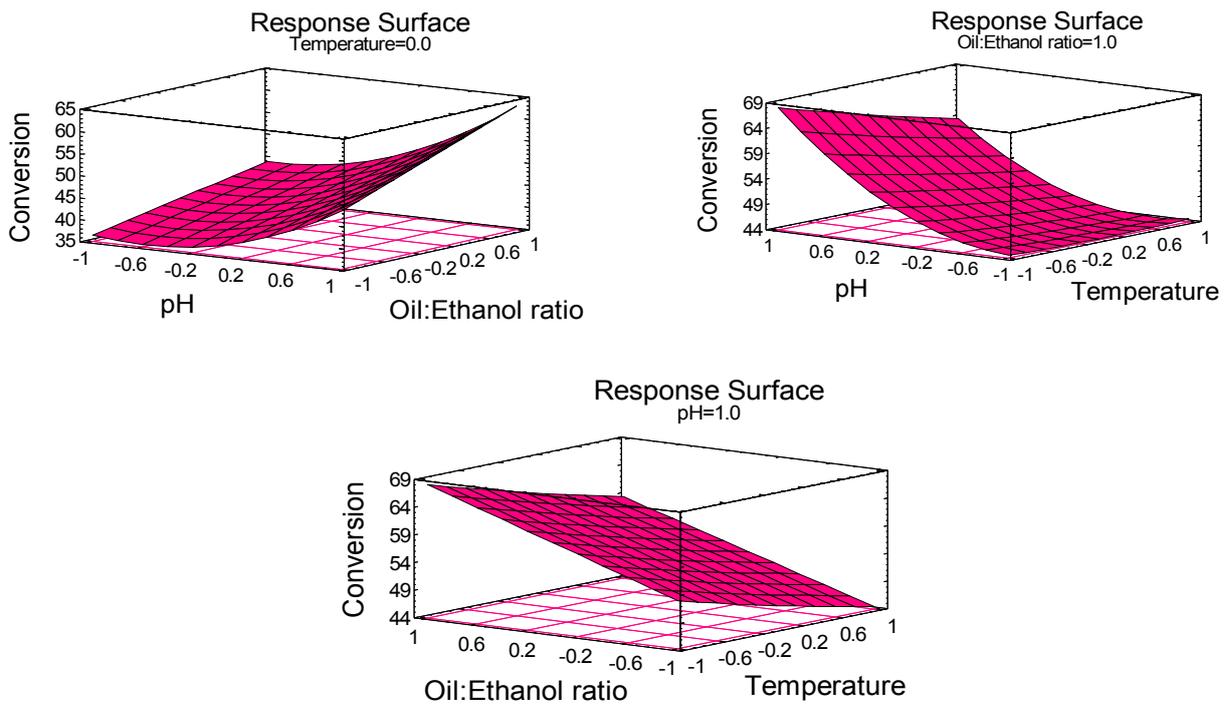


Figura 4.27. Superficies de respuesta para la variable de salida conversión.

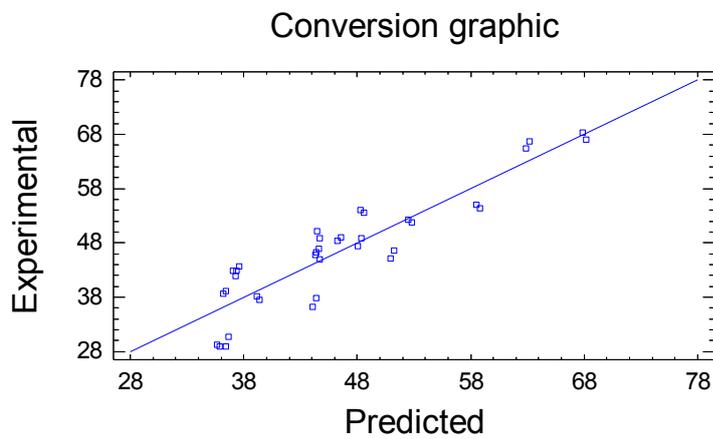


Figura 4.28. Gráfico de correlación entre valores experimentales y predichos por el modelo estadístico, para la variable de salida conversión.

Se obtiene la siguiente ecuación para el modelo calculado:

$$\text{Conversión} = 42,82 - 2,05*T + 7,62*pH + 5,63*R + 0,33*T^2 - 2,34*T*pH - 0,29*T*R + 5,19*pH^2 + 1,78*pH*R$$

En este caso, una simplificación del modelo eliminando de este las variable estadísticamente no significativas, hace que se obtenga un R² de 74.6 %, lo cual está fuera de los límites permisibles anteriormente expuestos. Por ello, en este caso no se lleva a cabo una simplificación del modelo estadístico, ya que la simplificación de éste conlleva un merma en los coeficientes de correlación.

Seguidamente se ha realizado un estudio de la influencia de la temperatura, pH y relación aceite/etanol en el contenido en FAEE de la mezcla final de reacción. A continuación se presenta una discusión de los resultados obtenidos.

En la **Figura 4.29** se muestra el diagrama de Pareto para la variable de salida contenido en FAEE.

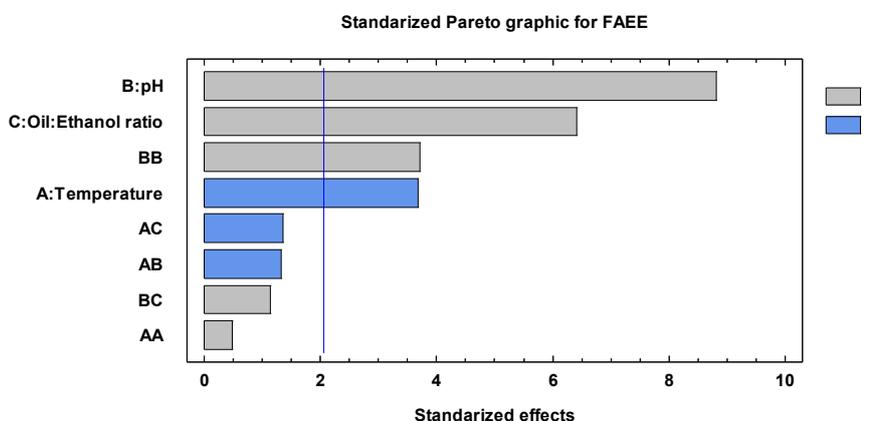


Figura 4.29. Gráfico de Pareto para la variable de salida contenido en FAEE.

En este caso se puede ver como existen cuatro factores estadísticamente significativos, pH, relación aceite/etanol, temperatura y pH², aunque claramente se observa que los más influyentes son pH y relación aceite/etanol. Se puede destacar, que aquí la temperatura tiene un efecto negativo, de manera que al aumentar la temperatura de reacción se produce un descenso en el contenido en FAEE, mientras que los otros tres factores ejercen una influencia positiva.

De igual manera en la **Figura 4.30**, se muestra el gráfico de efectos principales, donde se observa gráficamente la magnitud de la significación estadística de cada uno de los tres factores estudiados. Se puede ver de manera clara como el pH es la variable más influyente, como puede deducirse de la gran pendiente positiva que presenta en el gráfico de efectos principales. Se ve también como la temperatura tiene una pendiente negativa, de donde se deduce que su efecto en el contenido en FAEE es negativo y menos acusado que los otros dos factores estudiados.

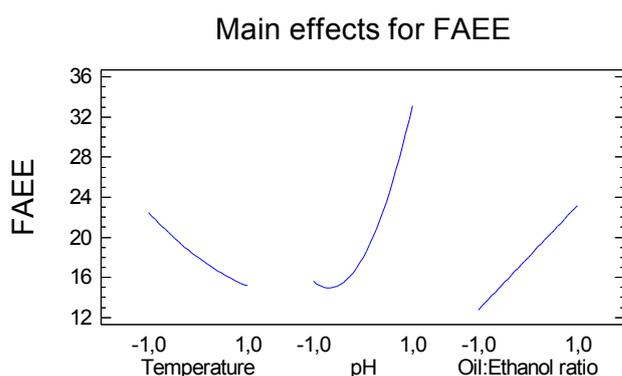


Figura 4.30. Gráfico de efectos principales para la variable de salida contenido en FAEE.

En la **Figura 4.31**, se muestran las superficies de respuesta obtenidas del modelo creado y para la variable de salida contenido en FAEE.

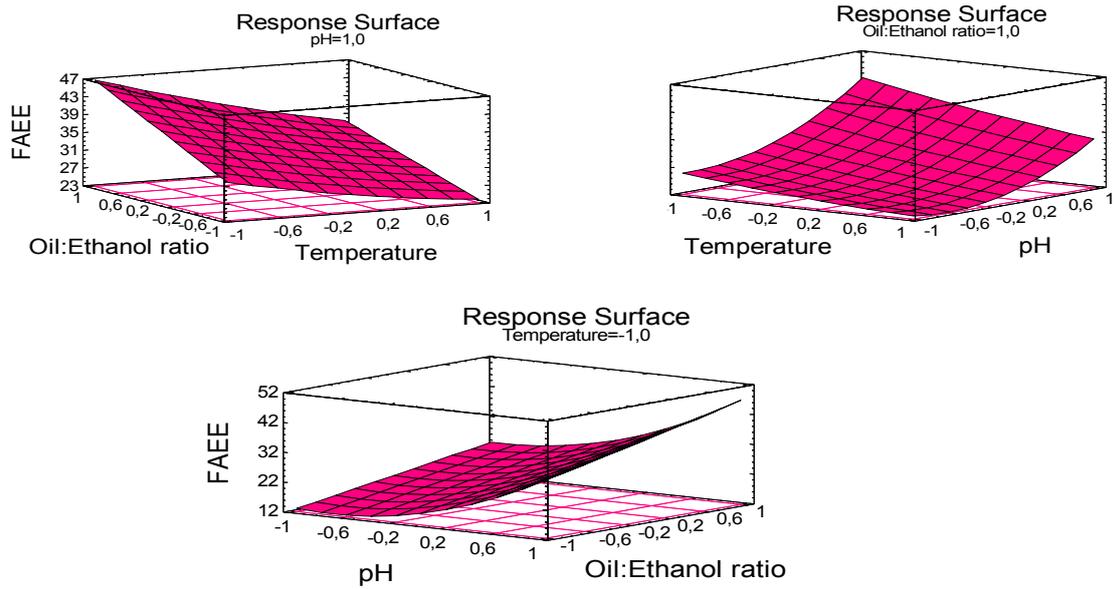


Figura 4.31. Superficies de respuesta para la variable de salida contenido en FAEE.

El modelo creado para explicar la variable de salida FAEE, tiene un R^2 de 85.4 %, lo cual está dentro de los límites permisibles para el tipo de sistema en estudio. Este coeficiente de correlación puede verse de manera gráfica en la **Figura 4.32**, donde se muestra en gráfico la correlación entre los valores experimentales y predichos por el modelo para la variable de salida contenido en FAEE.

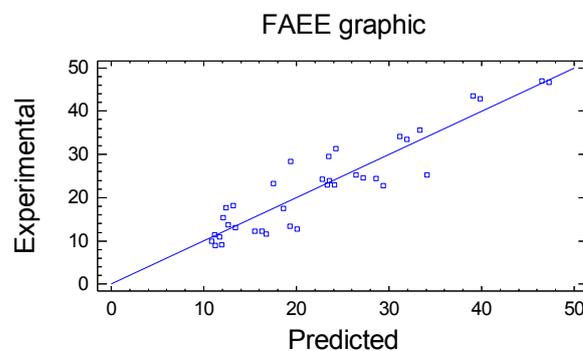


Figura 4.32. Gráfico de correlación entre valores experimentales y predichos por el modelo estadístico, para la variable de salida contenido en FAEE.

La ecuación resultante de la modelización llevada a cabo se muestra a continuación:

$$FAEE = 17,97 - 3,65*T + 8,77*pH + 5,20*R + 0,82*T^2 - 1,61*T*pH - 1,34*T*R + 6,39*pH^2 + 1,13*pH*R$$

Se puede realizar una simplificación del modelo estadístico propuesto, de manera que se eliminan de éste las variables sin significación estadística. En este caso y tras eliminar del modelo las variables sin peso estadístico, se obtiene un nuevo modelo simplificado donde ahora se tiene un coeficiente de correlación entre los valores experimentales y predichos igual a 82.5 %, el cual sigue siendo un valor suficientemente aceptable.

En la **Figura 4.33** puede verse el gráfico de efectos principales para el nuevo modelo simplificado, donde al igual que en casos anteriores, se muestran líneas rectas para las variables que tienen un efecto simple y curvas para las que tienen un efecto de segundo orden, en este caso pH.

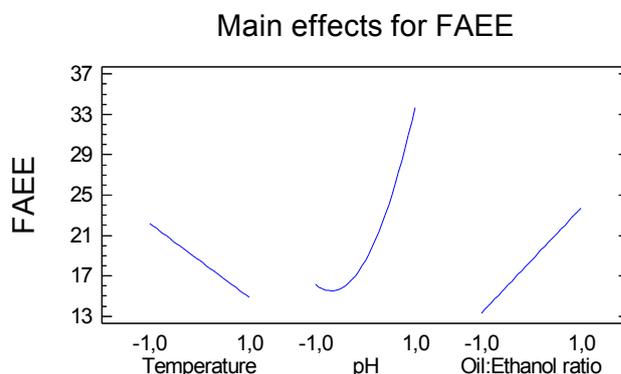


Figura 4.32. Gráfico de efectos principales para la variable de salida contenido en FAEE en el modelo simplificado.

En la **Figura 4.33** se muestran las superficies de respuesta obtenidas para el modelo simplificado, donde se observa que la superficie en la que no interviene el pH, que es la única variable que presenta una relación de segundo orden significativa, presenta una superficie lineal, como es de prever. En cambio, las otras dos superficies de respuesta presentan un comportamiento cuadrático, ya que en ellas se representa el pH que en este caso tiene una relación de segundo orden.

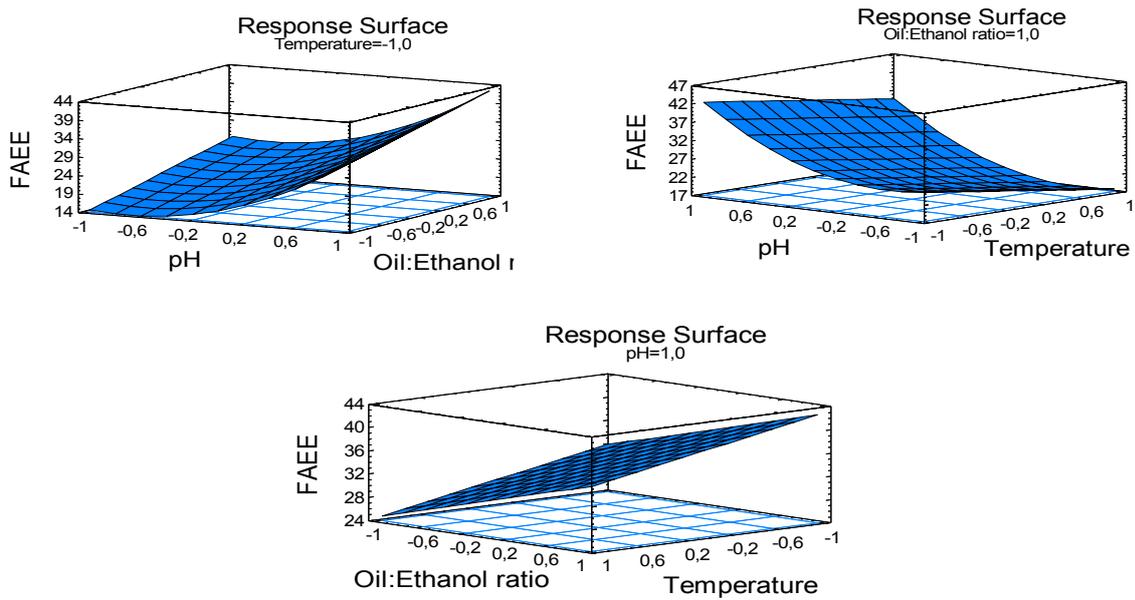


Figura 4.31. Superficies de respuesta para la variable de salida contenido en FAEE.

El modelo simplificado para la variable contenido en FAEE, tiene un coeficiente de correlación del 82.5 %, por lo que se ha producido un leve descenso del coeficiente de correlación, aunque éste sigue siendo aceptable. Esto puede verse en la **Figura 4.32**, donde se representa el gráfico de correlación entre los valores experimentales y predichos.

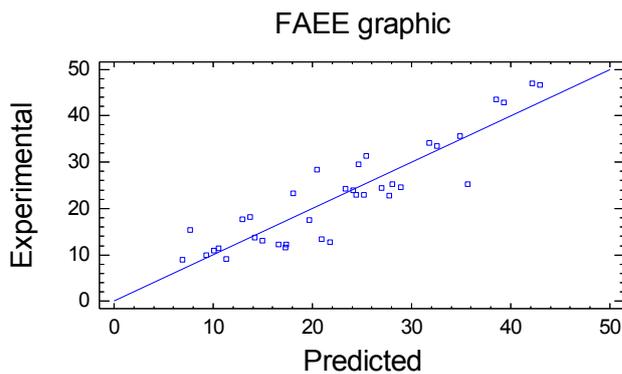


Figura 4.32. Gráfico de correlación entre valores experimentales y predichos por el modelo estadístico, para la variable de salida contenido en FAEE en el modelo simplificado.

La ecuación resultante para el modelo simplificado es la siguiente:

$$\text{FAEE} = 18,52 - 3,65 \cdot T + 8,77 \cdot \text{pH} + 5,20 \cdot R + 6,39 \cdot \text{pH}^2$$

Puede entonces concluirse que el modelo simplificado obtenido puede ser utilizado con buenos resultados en la predicción del contenido en FAEE en el rango estudiado para cada variable.

Por último, en la **Tabla 4.2**, se muestran los resultados de los experimentos realizados para validar el modelo creado. Se puede observar como las desviaciones obtenidas entre los valores experimentales y calculados a partir del modelo creado, están dentro de un rango de errores aceptables, ya que las diferencias entre ambos valores, experimental y pronosticado, no superan el 5 %. Puede por tanto concluirse que, tal como se extraía de los datos del análisis ANOVA, este modelo predice de forma adecuada el comportamiento del sistema en estudio dentro de los rangos estudiados para cada variable, dando a su vez información de las condiciones óptimas de operación para maximizar las variables conversión y contenido en FAEE, así como para minimizar la variable viscosidad cinemática.

Tabla 4.2. Experimentos de validación de los modelos simplificados para la enzima Lipopan 50 BG.

Temperatura °C	pH	Aceite/Etanol ratio	Conversión (%)		FAEE (%)		Viscosidad (mm ² /s)	
			Exp.	Ajust.	Exp.	Ajust.	Exp.	Ajust.
25	11.5	12/2.9	40.6	42.9	43.5	41.5	9.0	9.8
30	10.5	12/2.75	46.7	43.9	26.2	27.0	11.7	11.0
50	9	12/2.3	47.6	51.8	18.8	17.3	12.1	11.1

A continuación, se ha llevado a cabo también un análisis de la influencia de los parámetros de reacción en la variable de salida viscosidad cinemática. Tal como se pudo deducir del análisis ANOVA llevado a cabo para esta variable, se obtienen unos valores de R² inferiores al 80 %, por lo que se considera que no existe una correlación suficiente para poder utilizar el modelo propuesto. En este caso se obtiene un R² de 79.3 %, que aunque estando en el límite marcado (80 %) se considera insuficiente.

De todas formas, se muestra a continuación el gráfico de Pareto (**Figura 4.33**) y el gráfico de correlación (**Figura 4.34**) donde se puede ver de manera clara que la relación aceite/etanol es el factor estadístico de más peso, siendo además un efecto negativo, lo que indica, que un aumento de la relación aceite/etanol, o sea, un aumento del contenido en etanol (ya que inicialmente se ha considerado como valor clave 1, una relación 12/3.5 y como -1 una relación 12/2, lo que implica que al aumentar desde -1 a 1, se produce un aumento del contenido en etanol), provoca una disminución de la viscosidad cinemática. Se puede observar también como en este caso la correlación entre valores experimentales y calculados es menor que en los casos anteriores, ya que se observan puntos que no se ajustan a la recta de correlación.

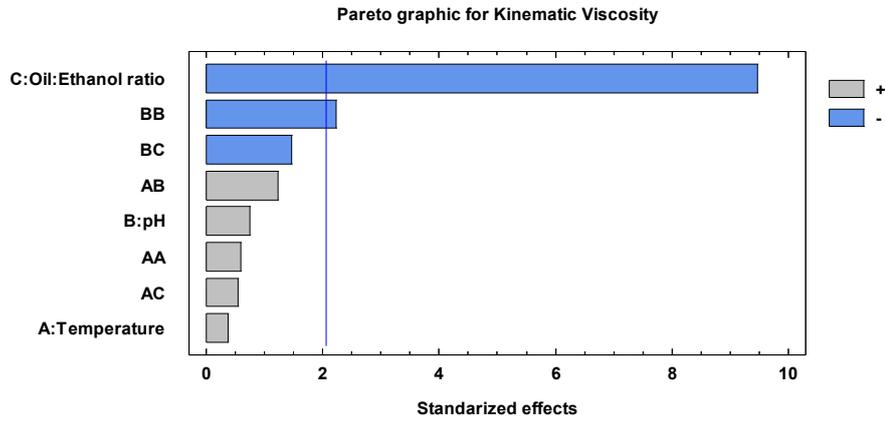


Figura 4.33. Gráfico de Pareto para la variable de salida viscosidad cinemática.

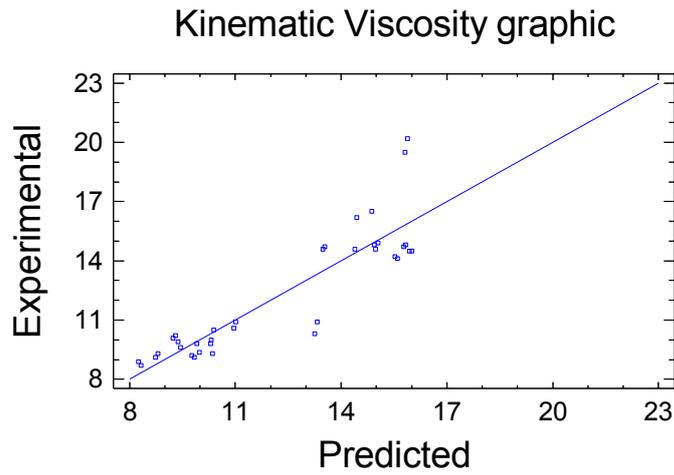


Figura 4.34. Gráfico de correlación entre valores experimentales y predichos por el modelo estadístico, para la variable de salida viscosidad cinemática.

V

RESULTADOS Y DISCUSIÓN: LIPASAS
INMOVILIZADAS

5.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN: LIPASAS INMOVILIZADAS

En este capítulo se lleva a cabo la evaluación de los resultados obtenidos al emplear alguna de las lipasas estudiadas en forma inmovilizada. La heterogeneización de la lipasa seleccionada (Biolipasa R) se lleva a cabo mediante dos metodologías, de forma covalente, sobre el soporte AlPO_4 /Sepiolita, activado y funcionalizado según los procedimientos que se describen en los siguientes apartados, además de ser inmovilizada por retención física en sepiolita desmineralizada.

La inmovilización covalente de la enzima se efectúa mediante la creación de un híbrido inorgánico-orgánico formado a través de una cadena hidrocarbonada enlazada con el soporte inorgánico mediante enlaces fosfamidicos, según se describe en el epígrafe 2.2.2, **Figuras 2.8 y 2.9**. La inmovilización de enzimas también se ha llevado a cabo empleando un procedimiento basado en la adsorción física de éstas en la estructura porosa tridimensional de las sepiolitas, **Figura 2.4**, que han sido sometidas a un tratamiento ácido, patente propiedad de la Universidad de Córdoba [90 - 92, 102], y que es el que se usa en el presente trabajo para la inmovilización por adsorción de la lipasa seleccionada.

También se han estudiado dos lipasas inmovilizadas de la marca Novozymes®, Lipozyme RM IM y Novozyme 435, ambas ampliamente utilizadas en la industria e investigación. Se pretende explorar la capacidad de estas enzimas comerciales para la producción de biocombustible, así como llevar a cabo una comparativa entre el rendimiento de enzimas inmovilizadas comerciales y la enzima seleccionada en la presente memoria para ser inmovilizada mediante los procedimientos patentados citados. [90 - 92, 102].

En la fase inicial de los primeros ensayos con estas lipasas, se descartó la Novozyme 435 al observar que el soporte polimérico utilizado para inmovilizar esta enzima era rápidamente degradado en el medio de reacción, lo

que impedía su reutilización. En este sentido, a pesar de que existen multitud de publicaciones en las que esta lipasa es utilizada en la producción de biodiesel, no se han encontrado referencias a dicha degradación. Según nuestras observaciones experimentales, la degradación del soporte probablemente es causada por el alto poder disolvente que posee el biodiesel, dado que esta constituido por grupos ésteres de ácidos carboxílicos.

5.1

INMOVILIZACION DE LA BIOLIPASA R

En el presente capítulo se muestran los resultados del proceso de inmovilización, activación y funcionalización, llevado a cabo con diferentes soportes, mediante inmovilización covalente y por retención física de la lipasa LR, seleccionada de entre todas las lipasas estudiadas, operando en forma libre. Se presentan tanto los resultados obtenidos en cada etapa del proceso, como los datos de eficiencia del proceso, y datos de conversiones y composición de las reacciones de transesterificación efectuadas en diferentes condiciones con los sistemas inmovilizados seleccionados.

En este capítulo se muestran también los resultados de las reacciones de transesterificación realizadas con una lipasa comercial inmovilizada 1,3-estereoespecífica, procedente del microorganismo *Rhizomucor miehei*, Lipozyme RM IM, inmovilizada en una resina macroporosa de intercambio aniónico.

5.1.1

CARACTERIZACIÓN SUPERFICIAL DE LOS MATERIALES UTILIZADOS COMO SOPORTE

En la **Tabla 5.1** se muestran los valores obtenidos para los materiales sintetizados, tanto del área superficial, S_{BET} (m^2g^{-1}), determinada mediante adsorción de nitrógeno por el método B.E.T (Brunauer, Emmett y Teller), como los valores de acidez y basicidad, en función de la cantidad de agente valorante adsorbido ($\mu\text{mol g}^{-1}$) en cada caso.

Tabla 5.1. Área superficial S_{BET} (m^2g^{-1}) y propiedades ácido-básicas de los materiales utilizados como soporte, obtenidas mediante valoración con piridina (PY, $pK_a= 5.3$), 2,6-dimetilpiridina (DMPY, $pK_a = 7$) y ácido benzoico (BA, $pK_a=4.19$).

Material	S_{BET}	Acidez		Basicidad
		Piridina	Dimetilpiridina	Ac. Benzoico
AlPO ₄	223	194	241	348
Sepiolita	246	14	17	118
AlPO ₄ /Sepiolita	128	201	129	403

Se puede decir por tanto que el ortofosfato de aluminio amorfo es un sólido inorgánico, de elevada superficie y elevado número de centros ácidos superficiales, procedentes de “defectos” superficiales de la red tridimensional “-P-O-Al-“ que si bien en su conjunto es neutra, localmente presenta en su superficie, centros ácidos Brønsted y Lewis, procedentes de enlaces -P-O-H, y -O-Al-O- respectivamente, así como centros básicos Brønsted y Lewis, debidos a los enlaces correspondientes a Al-O-H y P-Ö-Al. Este número es muy variable, dependiendo del método de síntesis empleado: temperatura, pH, velocidad, orden de adición de los reactivos, etc.

5.1.2

FUNCIONALIZACIÓN Y ACTIVACIÓN DEL SISTEMA AlPO₄/SEPIOLITA UTILIZADO COMO SOPORTE

La funcionalización del sistema AlPO₄/Sepiolita, utilizado como soporte inorgánico para la inmovilización covalente de enzimas [90 - 92, 102], se ha llevado a cabo por interacción superficial de los centros ácidos Brønsted con dos moléculas diferentes, p-hidroxibenzaldehído y 4-amino-bencilamina,

generando así híbridos orgánico-inorgánicas capaces de fijar las lipasas. Esta reacción superficial se realiza en ausencia de disolvente, y sometiendo el sólido activado, en el que se ha impregnado el p-hidroxibenzaldehído o la 4-amino-bencilamina, a irradiación en microondas durante breves minutos.

Para la inmovilización covalente de la lipasa, usando como soporte AlPO_4 /Sepiolita (20-80 % en peso), previamente activados con 4-aminobencilamina y aldehído tereftálico, de acuerdo con la síntesis en fase sólida, por pasos recogida en la **Figura 2.8**, la activación del soporte se realizará mediante la consecución de un *linker* con la funcionalización adecuada para que la enzima pueda unirse al soporte con un enlace covalente. Para ello se harán reaccionar los grupos hidroxilos superficiales de carácter ácido del soporte con una diamina, la 4-aminobencilamina, y posteriormente con un dialdehído aromático, el tereftaldialdehído, que aportará un grupo carbonilo terminal, con el que los grupos amino libres de la enzima formarán el enlace imínico. El proceso de activación se lleva a cabo, por tanto, en dos etapas, pudiéndose efectuar en el mismo matraz de reacción, tras el lavado conveniente del sólido, tras cada reacción. Además, ambas reacciones se efectúan de forma rápida y limpia, en un horno microondas convencional.

En cuanto a la activación del soporte utilizando únicamente p-hidroxibenzaldehído, se sigue el esquema de reacción mostrado en la **Figura 2.9**, donde se observa un proceso en el que el grupo hidroxilo (fenólico) del p-hidroxibenzaldehído reacciona con un grupo hidroxilo superficial de carácter ácido Brønsted del soporte produciéndose un enlace éster, y la eliminación de una molécula de agua, en el proceso.

5.1.2.1

FUNCIONALIZACIÓN Y ACTIVACIÓN DEL SOPORTE ALPO₄/SEPIOLITA POR REACCIÓN CON 4-AMINOBENCILAMINA Y TEREFTALDIALDEHÍDO

La reacción de los grupos ácidos superficiales del soporte, con uno de los grupos amino terminales de la aminobencilamina, se lleva a cabo mediante la homogeneización en un matraz de 100 ml, de 20 g del soporte AlPO₄/Sepiolita, 80 ml de éter etílico y 4 ml de aminobencilamina (Merck, 99 %), durante una hora en rotavapor a temperatura ambiente. Estas cantidades proporcionan las condiciones denominadas de “humedad incipiente” que permiten la homogeneización de la mezcla empleando la mínima cantidad de disolvente. A continuación se elimina el éter etílico, por calentamiento en baño de agua en el mismo rotavapor pero sin efectuar vacío, ya que hierve a 33 °C. A continuación se introduce el matraz en un horno microondas doméstico donde se le somete, durante quince minutos (en periodos de 2 minutos), a irradiación a 380 W. Tras varios lavados con éter etílico del sólido funcionalizado, para eliminar el reactivo que no ha reaccionado con el sólido, éste se vuelve a impregnar en rotavapor con aldehído tereftálico, 4 g, que tras eliminar en rotavapor el éter etílico, se somete a una nueva activación en microondas, irradiando a 380 W durante cinco minutos. La alta conjugación de la molécula enlazada al soporte inorgánico, tras la formación del enlace imínico, proporciona un color amarillo intenso al sólido activado (**Figura 5.2**). Eliminado el aldehído tereftálico que no ha reaccionado por lavado con éter etílico, el soporte activado está listo para ser empleado en la inmovilización de las lipasas.

La eficiencia del proceso de inmovilización se confirma mediante la técnica de espectroscopia de Ultravioleta Visible con Reflectancia Difusa, UV-vis-RD dada la gran sensibilidad que presenta dicha técnica, lo que la hace especialmente útil e imprescindible en el seguimiento de la evolución de las superficies de los sólidos tras los tratamientos de funcionalización y/o sucesivas modificaciones químicas superficiales. Se lleva a cabo en un

espectrofotómetro de UV-RD Varian Carey 1E, realizando barridos correspondientes a longitudes de onda entre 200 y 900 nm. A partir de los correspondientes espectros obtenidos en cada una de las diferentes etapas (**Figura 5.1**), se pueden evidenciar los cambios producidos en la superficie del sólido inorgánico empleado como soporte en los sucesivos tratamientos que conducen a su funcionalización con grupos aldehídos superficiales (**Figura 2.8**), capaces de reaccionar con aminoácidos de las enzimas. Estos cambios se pueden observar también visualmente en la **Figura 5.2**.

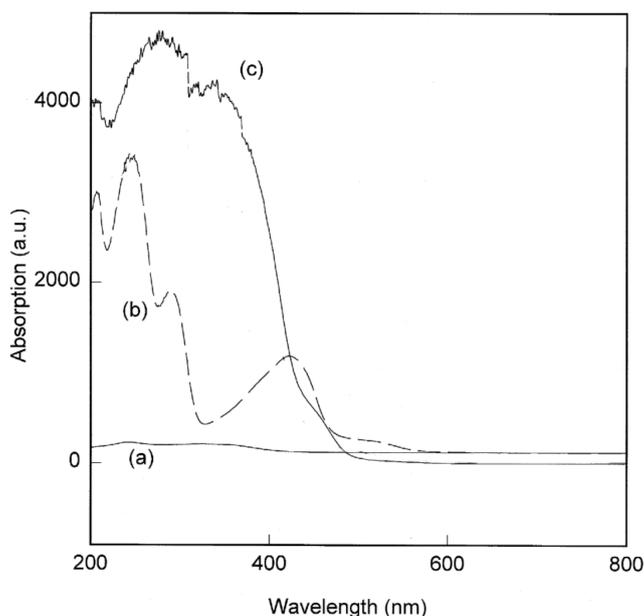


Figura 5.1. Espectroscopía de UV-vis-RD obtenidas en las diferentes etapas representadas en la Figura 3.6: (a) soporte Sepiolita/ AlPO_4 ; (b) soporte activado después del calentamiento por microondas con 4-aminobenzilamina, (c) soporte funcionalizado con el tereftaldialdehído.



Figura 5.2. De izquierda a derecha se presentan las imágenes de (a) soporte Sepiolita/ AlPO_4 , (b) soporte Sepiolita/ AlPO_4 activado después del calentamiento por microondas con 4-aminobenzilamina (c) soporte funcionalizado con el tereftaldialdehído

5.1.2.2

FUNCIONALIZACIÓN Y ACTIVACIÓN DEL SOPORTE AlPO_4 /SEPIOLITA CON p-HIDROXIBENZALDEHÍDO

Siguiendo la síntesis en fase sólida, por pasos, recogida en la **Figura 2.9** y de acuerdo con la metodología publicada y patentada [90 - 92, 102], la funcionalización del soporte tiene lugar a través de la reacción entre 20 g de soporte y 2 g de p-hidroxibenzaldehído en un horno microondas convencional durante 15 minutos a 380 W, en periodos de 2 minutos. De forma similar al proceso seguido en el punto anterior, el sólido es homogeneizado con el p-hidroxibenzaldehído durante una hora en rotavapor a temperatura ambiente. Tras este periodo se elimina el éter etílico, por calentamiento en baño de agua en el mismo rotavapor sin efectuar vacío, y a continuación se efectúa la activación por microondas.

La activación del soporte se realiza mediante la consecución de un “*linker*” con la funcionalización adecuada para que la enzima pueda unirse al

soporte mediante un enlace covalente, para ello se hacen reaccionar los grupos hidroxilos superficiales de carácter ácido del soporte con un aldehído, el p-hidroxibenzaldehído, que aportará un grupo carbonilo terminal, con el que los grupos amino libres de la enzima formarán el enlace imínico.

Se usa el sistema AlPO_4 /Sepiolita como soporte, previamente activado y funcionalizado con p-hidroxibenzaldehído, de acuerdo con la síntesis en fase sólida, por pasos, recogida en la **Figura 2.9**, de acuerdo con la metodología anteriormente descrita. Aquí, se hacen reaccionar los grupos ácidos Brønsted superficiales de carácter ácido del soporte con el grupo p-hidroxilo de un aldehído, el p-hidroxibenzaldehído, que aporta un grupo carbonilo terminal, con el que los grupos amino libres de la enzima formarán el enlace imínico. Igualmente la reacción de activación se efectúa de forma rápida y limpia, en un horno de microondas convencional.

La eficiencia del proceso de inmovilización se confirma mediante espectroscopia de Ultravioleta Visible con Reflectancia Difusa, UV-vis-RD, cuyos resultados se muestran en la **Figura 5.3**.

A partir de los correspondientes espectros obtenidos en cada una de las diferentes etapas, podemos evidenciar los cambios producidos en la superficie del sólido inorgánico empleado como soporte en los sucesivos tratamientos que conducen a su funcionalización con grupos aldehídos superficiales, capaces de reaccionar e inmovilizar las enzimas.

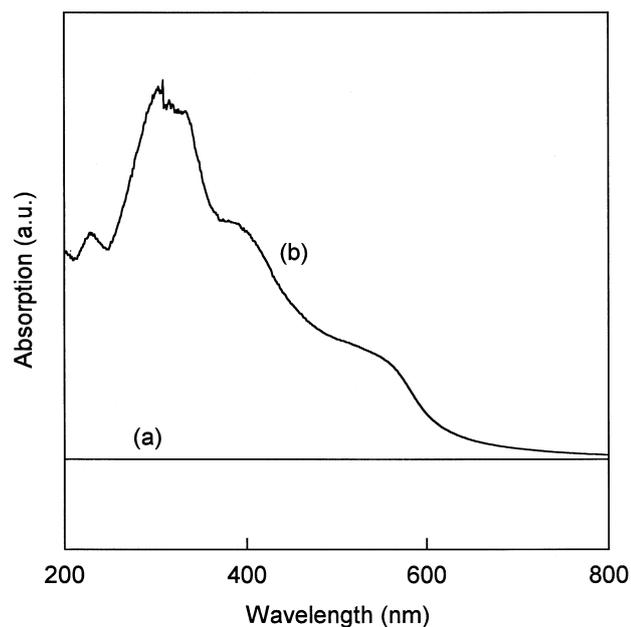


Figura 5.3. Espectroscopía de UV-vis-RD obtenidas en las diferentes etapas representadas en la Figura 3.6: (a) soporte Sepiolita/AlPO₄; (b) soporte activado después del calentamiento por microondas con p-Hidroxibenzaldehído.

5.1.3

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CATALÍTICA DE LOS SISTEMAS SEPIOLITA/AlPO₄

Para evaluar la actividad catalítica de los sistemas sintetizados, se llevan a cabo reacciones de transesterificación con el sobrenadante separado tras la inmovilización, con el sistema heterogeneizado, así como con la enzima en forma nativa, para posteriormente obtener las velocidades de reacción de cada sistema.

La cantidad de enzima retenida por inmovilización, se puede saber calculando el porcentaje de enzima inmovilizada, E_{inm} , que se calcula mediante

la diferencia entre la actividad catalítica de la enzima nativa y la actividad del sobrenadante separado por centrifugación en cada uno de los procesos de inmovilización:

$$E_{\text{imm}} = \frac{r_{\text{nat}} - r_{\text{fil}}}{r_{\text{nat}}} \times 100$$

La actividad residual después de la inmovilización, obtenida del porcentaje de enzima inmovilizada catalíticamente activa, E_{res} , se determina de la relación entre las actividades de la enzima inmovilizada y nativa:

$$E_{\text{res}} = \frac{r_{\text{imm}}}{r_{\text{nat}}} \times 100$$

La actividad específica, E_{spe} , es indicativa de la eficiencia de la enzima inmovilizada con respecto a la enzima nativa, y se puede obtener de la siguiente relación:

$$E_{\text{spe}} = \frac{E_{\text{res}}}{E_{\text{imm}}} \times 100 = \frac{r_{\text{imm}}}{r_{\text{nat}} - r_{\text{fil}}} \times 100$$

En las **Tablas 5.3** y **5.4**, se pueden ver las velocidades de reacción obtenidas para el sistema inmovilizado, usando el *linker* p-hidroxibenzaldehído y 4-aminobencilamina más aldehído tereftálico, respectivamente. En ambos casos se opera a una temperatura de 30 °C y a dos valores de pH. También se obtienen las cantidades de enzima inmovilizada (E_{imm}), la actividad residual (E_{res}) y la actividad específica (E_{spe}).

Tabla 5.3. Porcentaje de enzima inmovilizada, E_{inm} , actividad residual, E_{res} , y actividad específica de la enzima inmovilizada, E_{spe} , determinadas a partir de los correspondientes valores de actividad catalítica (mmol/min) de la enzima nativa, r_{nat} , la actividad del filtrado en el proceso de inmovilización, r_{fil} , y la actividad de la enzima inmovilizada, r_{inm} , para el *linker* p-hidroxibenzaldehído. La inmovilización se ha llevado a cabo a pH 7 y 9, y 30 °C.

pH	$r_{nat} 10^2$ (mmol/min)	$r_{fil} 10^2$ (mmol/min)	$r_{inm} 10^2$ (mmol/min)	E_{inm} (%)	E_{res} (%)	E_{spe} (%)
7	14.28	2.9	1.8	79.7	12.6	15.8
9	12.5	10.0	9.0	20.0	72.0	360.0

Tabla 5.4. Porcentaje de enzima inmovilizada, E_{inm} , actividad residual, E_{res} , y actividad específica de la enzima inmovilizada, E_{spe} , determinadas a partir de los correspondientes valores de actividad catalítica (mmol/min) de la enzima nativa, r_{nat} , la actividad del filtrado en el proceso de inmovilización, r_{fil} , y la actividad de la enzima inmovilizada, r_{inm} , para el *linker* 4-aminobencilamina + tereftaldialdehído. La inmovilización se ha llevado a cabo a pH 7 y 9, y 30°C.

pH	$r_{nat} 10^2$ (mmol/min)	$r_{fil} 10^2$ (mmol/min)	$r_{inm} 10^2$ (mmol/min)	E_{inm} (%)	E_{res} (%)	E_{spe} (%)
7	14.3	12.8	4.6	10.4	32.2	310.8
9	12.5	7.0	5.9	44.0	47.2	107.0

A la vista de los resultados obtenidos se pueden obtener varias conclusiones, relativas al pH de operación y del método de inmovilización. Cuando se emplea p-hidroxibenzaldehído como activante, se observa una influencia muy importante del pH de operación en el proceso de inmovilización, de forma que a pH 7 se consigue fijar el 79.7 % de la lipasa, frente al 20.0 % que se obtiene a pH 9. No obstante, la calidad de la lipasa inmovilizada a pH 7 es claramente menor que la obtenida a pH 9, donde la

actividad residual, E_{res} , y específica, E_{spe} , de las enzimas inmovilizadas son muy superiores.

Al operar con un *linker* de mayor tamaño, como en el caso de 4-aminobencilamina unida a aldehído tereftálico, sucede de manera inversa, obteniéndose mayor cantidad de lipasa inmovilizada al operar a mayor pH, también con mayor actividad residual, E_{res} , aunque con menor actividad específica, E_{spe} . Es decir, en este caso la lipasa inmovilizada funciona de manera menos eficiente que la libre.

La comparación entre ambos sistemas de activación parece aconsejar el empleo de p-hidroxibenzaldehído como agente activante del sólido inorgánico, operando a pH 9. Además, este método es comparativamente más simple, pues la activación se lleva a cabo en un solo paso, frente a los dos necesarios con el proceso que emplea 4-aminobencilamina y aldehído tereftálico.

5.1.4

SISTEMA QUE USA SEPIOLITA COMO MÉTODO DE RETENCIÓN FÍSICA

A fin de evaluar el posterior efecto del tratamiento de desmineralización, se realizan una serie de ensayos en los que se emplea sepiolita de Tolsa S.A, Vallecas (Madrid), con un solo lavado con agua desionizada. Estos resultados se comparan con los obtenidos cuando esta misma sepiolita es sometida a un tratamiento ácido desmineralizante, como soporte de la lipasa [102], frente a la producción de Biodiesel mediante la transesterificación de aceite de girasol con etanol absoluto.

Para llevar a cabo la inmovilización de la enzima sobre la sepiolita natural, tanto desmineralizada como sin desmineralizar, se sigue la metodología descrita [102], poniendo en contacto en el matraz de reacción 5 g de esta sepiolita sin desmineralizar, 0.2 g de lipasa, 5 ml de etanol

absoluto y 5 ml de agua destilada. Antes de efectuar la reacción se mantiene con agitación controlada en rotavapor durante 1 hora a temperatura ambiente.

El tratamiento ácido desmineralizante se lleva a cabo en las condiciones previamente descritas. Cada ocho horas, se determina la presencia de Mg en el sobrenadante empleando “amarillo titán” como indicador específico. El ataque ácido se repite hasta que se determina la ausencia de Mg. Para mantener la estructura fibrosa así obtenida, el sólido resultante se mantiene en todo momento en condiciones de humedad incipiente. Para la inmovilización de la enzima se sigue la metodología anteriormente descrita.

A fin de evaluar los resultados del tratamiento ácido desmineralizante, se han medido las actividades de la enzima nativa, el filtrado resultante de la inmovilización así como de la enzima inmovilizada en el sólido. En la **Tabla 5.5** se muestran los resultados obtenidos para la inmovilización de la lipasa en sepiolita sin desmineralizar, y en la **Tabla 5.6** los de la sepiolita desmineralizada. Las reacciones para determinar la actividad catalítica se han llevado a cabo a 30 °C.

Tabla 5.5. Porcentaje de enzima inmovilizada, E_{inm} , actividad residual, E_{res} , y actividad específica de la enzima inmovilizada, E_{spe} , determinadas a partir de los correspondientes valores de actividad catalítica (mmol/min) de la enzima nativa, r_{nat} , la actividad del filtrado en el proceso de inmovilización, r_{fil} , y la actividad de la enzima inmovilizada, r_{inm} , para la lipasa inmovilizada en sepiolita sin desmineralizar. La inmovilización se ha llevado a cabo a pH 7 y 9.

pH	$r_{nat} 10^2$ (mmol/min)	$r_{fil} 10^2$ (mmol/min)	$r_{inm} 10^2$ (mmol/min)	E_{inm} (%)	E_{res} (%)	E_{spe} (%)
7	14.1	12.8	0.6	9.2	4.3	46.7
9	14.5	13.5	1.2	6.9	8.3	120.3

Tabla 5.6. Porcentaje de enzima inmovilizada, E_{inm} , actividad residual, E_{res} , y actividad específica de la enzima inmovilizada, E_{spe} , determinadas a partir de los correspondientes valores de actividad catalítica (mmol/min) de la enzima nativa, r_{nat} , la actividad del filtrado en el proceso de inmovilización, r_{fil} , y la actividad de la enzima inmovilizada, r_{inm} , para la lipasa inmovilizada en sepiolita desmineralizada. La inmovilización se ha llevado a cabo a pH 7 y 9.

pH	$r_{nat} 10^2$ (mmol/min)	$r_{fil} 10^2$ (mmol/min)	$r_{inm} 10^2$ (mmol/min)	E_{inm} (%)	E_{res} (%)	E_{spe} (%)
7	14.7	6.1	7.8	58.5	53.0	90.6
9	14.2	4.7	9.2	66.9	64.8	96.9

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que el tratamiento de desmineralización es imprescindible para incrementar de forma notable la capacidad de inmovilización del soporte sepiolita. Además, con la sepiolita desmineralizada, los valores de todos los parámetros evaluados, porcentaje de enzima inmovilizada, E_{inm} , actividad residual, E_{res} , y actividad específica, E_{spe} , presentan resultados levemente mejores que los obtenidos con la inmovilización covalente sobre el soporte $AlPO_4$ /Sepiolita, por cualquiera de los dos métodos investigados.

Se puede concluir que mediante la retención física llevada a cabo en sepiolita previamente desmineralizada y a pH 9, se obtienen los mejores resultados de actividad para la lipasa inmovilizada.

5.1.5

REUTILIZACIÓN DE LOS SISTEMAS INMOVILIZADOS

Se han llevado a cabo reacciones sucesivas utilizando los dos sistemas de inmovilización que se han considerado más apropiados. Para ello se han realizado tandas de reacciones reutilizando la enzima inmovilizada tanto de forma covalente usando p-hidroxibenzaldehído como *linker* y a pH 9, así como la lipasa inmovilizada por retención física a pH 9 en sepiolita desmineralizada.

Previamente a la reutilización de la enzima soportada, ésta se somete a un lavado con una disolución 100 mM de tampón fosfato a pH 8, y se seca en desecador durante 2 horas.

En la **Tabla 5.7** se muestran los resultados de las reacciones llevadas a cabo con ambos sistemas de inmovilización, a 30 °C, con 12 ml de aceite, 3.5 ml de etanol absoluto y pH 11, considerando estas condiciones, obtenidas evaluando la enzima en forma libre, como óptimas para esta lipasa. La cantidad de enzima inmovilizada usada en ambos casos fue un 15 % en peso con respecto al aceite utilizado.

En la **Figura 5.4**, se puede observar más fácilmente la actividad residual de cada sistema de inmovilización seleccionado tras cada uso. Puede verse como el sistema que usa p-hidroxibenzaldehído como *linker* para inmovilización covalente presenta un comportamiento más estable, manteniendo la actividad prácticamente al 100 % hasta el cuarto uso, a partir del cual comienza una pérdida de actividad que se mantiene aceptablemente hasta el quinto uso. Por el contrario, el sistema que utiliza sepiolita desmineralizada como sistema de retención física, muestra una pérdida de actividad progresiva a partir del primer uso.

El comportamiento de ambos sistemas es totalmente congruente con el hecho de que la inmovilización covalente es un medio de inmovilización que permite obtener inmovilizaciones más estables, por lo que es completamente lógico que el sistema que usa p-hidroxibenzaldehído como *linker*, presente un comportamiento más estable manteniendo la actividad casi al 100 % en los

primeros cinco usos. Por el contrario, el sistema que usa sepiolita desmineralizada presenta un comportamiento menos estable, perdiendo la actividad progresivamente con los usos, probablemente debido a la lixiviación de la enzima, al ser un sistema de retención física y no por enlaces covalentes que aportan más estabilidad.

Tabla 5.7. Datos de reutilización de los dos sistemas de inmovilización seleccionados, inmovilización covalente usando p-hidroxibenzaldehído como *linker*, y sepiolita desmineralizada como soporte por retención física.

Nº USO	CONVERSIÓN (%)	FAEE (%)	MG+DG (%)	TG (%)
Lipasa LR inmovilizada usando p-hidroxibenzaldehído como <i>linker</i>				
1	84.3	59.1	25.2	15.7
2	83.7	53.2	30.5	16.3
3	83.1	52.9	30.2	16.9
4	83.6	54.3	29.3	16.4
5	77.8	42.8	35.0	22.2
6	61.3	36.3	25.0	38.7
7	40.1	28.9	11.2	59.9
8	34.2	22.3	11.9	65.8
9	21.4	15.6	5.8	78.6
Lipasa LR inmovilizada en sepiolita desionizada				
1	90.2	60.3	29.9	9.8
2	83.7	58.1	25.6	16.3
3	73.2	43.1	30.1	26.8
4	61.1	37.8	23.3	38.9
5	60.6	32.3	28.3	39.4
6	49.5	29.9	19.6	50.5
7	33.3	20.1	13.7	66.2
8	21.2	16.7	4.5	78.8
9	18.1	12.3	5.8	81.9

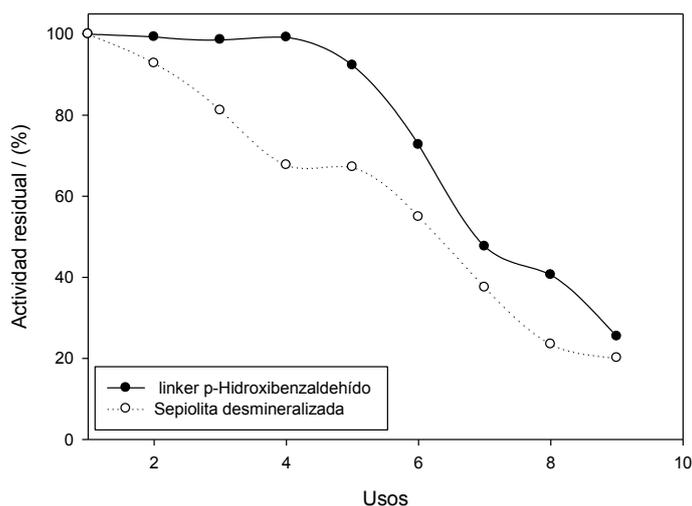


Figura 5.4. Datos de actividad residual de los dos sistemas de inmovilización seleccionados con distintos usos.

5.1.6

REACCIÓN CON RESIDUOS GRASOS DE ORIGEN ANIMAL

Los resultados obtenidos al emplear una fuente de triglicéridos residuales, como puede ser un residuo de grasa animal de la empresa Prolongo, rico en ácidos libres y glicéridos, puede constituir una comprobación reveladora de la estabilidad y capacidad del sistema enzimático en la transformación de aceites (o grasas) en biocombustibles.

Para ello se ha llevado a cabo un experimento donde se ha efectuado una reacción con etanol absoluto y una grasa de origen animal suministrada por dicha empresa, con la Biolipasa R inmovilizada covalentemente con p-hidroxibenzaldehído. Esta grasa proviene de un proceso de extracción y purificación de grasas de restos animales de mataderos. Debido al proceso de extracción, estas grasas presentan un elevado grado de acidez (5.1°), lo que imposibilita su utilización directa por el método enzimático desarrollado,

ya que la presencia de NaOH, necesaria para conseguir el pH óptimo requerido, provoca la formación de jabones por reacción con los ácidos grasos presentes en la materia prima.

Este problema se evita llevando a cabo una reacción de esterificación, previa a la reacción de transesterificación, consistente en una reacción de esterificación convencional con metanol en medio ácido, con la finalidad de esterificar los ácidos grasos libres con metanol para obtener ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME), y eliminar así los ácidos libres que imposibilitan la reacción de transesterificación con lipasas. Para ello se han usado 100 gr de grasa animal, y se han hecho reaccionar con 30 ml de metanol en presencia de 3 ml de ácido sulfúrico al 98 % a reflujo durante una hora. Tras esta reacción, el contenido del matraz se neutraliza con 1 ml de NaOH 10 N para eliminar la acidez remanente y separar el ácido sulfúrico como sulfato sódico precipitado. Posteriormente se separa una fase inferior acuosa y llena de sales que es desechada, y una fase superior homogénea que contiene glicéridos y esteres metílicos de ácidos grasos (FAME). Esta fase superior es utilizada para llevar a cabo ahora una reacción de transesterificación con 35 mL de etanol absoluto y 0.23 g de Biolipasa R soportada covalentemente con p-hidroxibenzaldehído, durante una hora a 30 °C.

5.2

LIPOZYME RM IM

En este apartado se discuten los resultados obtenidos con la lipasa comercial inmovilizada Lipozyme RM IM. A este respecto, se ha realizado un estudio para evaluar la influencia de varios parámetros de reacción en la actividad de esta lipasa.

Para el estudio de esta lipasa se ha optado por utilizar la misma relación volumétrica Aceite/Etanol 12/3.5, empleada con las demás enzimas estudiadas, ya que se ha observado que es la que mejores resultados ha arrojado en los estudios realizados en nuestros laboratorios con diferentes lipasas. Hemos utilizado una metodología OVAT (*One Variable At Time*) para estudiar la influencia de la temperatura, la carga de enzima utilizada y el contenido de agua en el medio de reacción. También hemos de indicar que todas las reacciones se han llevado a cabo a pH 11, también empleado con las demás lipasas estudiadas.

5.2.1

INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA DE REACCIÓN

Para estudiar la influencia de la temperatura de reacción en la conversión, se ha optado por realizar experimentos a diferentes temperaturas, entre 30 - 70 °C, con diferentes contenidos de lipasa en el medio.

En la **Figura 5.5** se pueden observar los resultados obtenidos, de donde fácilmente se puede apreciar un máximo de actividad a los 40 °C para los tres contenidos en lipasa estudiados. De la misma manera, puede apreciarse como se produce un leve aumento de actividad cuando el contenido en lipasa aumenta desde 20 á 50 mg, para caer drásticamente para un contenido de

lipasa de 100 mg. Debido a esta observación, se propone hacer una evaluación más detallada de la influencia del contenido en lipasa, para poder saber de forma más certera el contenido óptimo de biocatalizador necesario para obtener un máximo en la conversión.

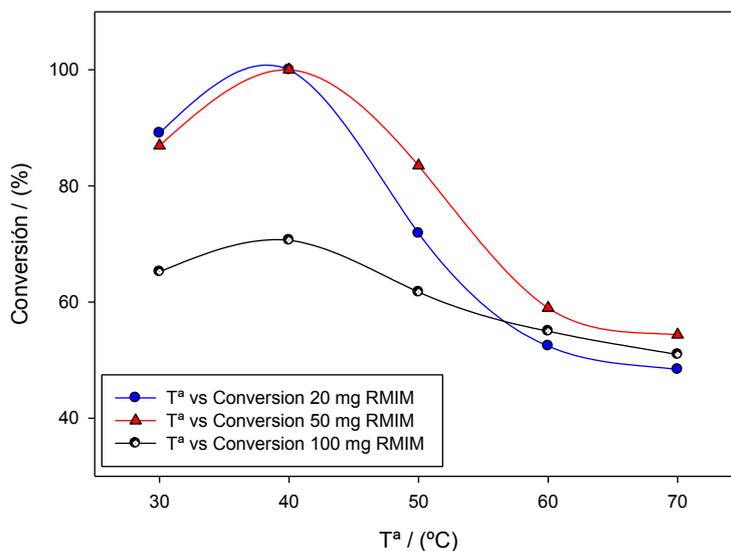


Figura 5.5. Datos de la influencia de la temperatura de reacción en la conversión para diferentes contenidos de lipasa en el medio.

5.2.2

INFLUENCIA DEL CONTENIDO DE LIPASA

Para evaluar la influencia del contenido de biocatalizador en el medio de reacción, y poder conocer con más exactitud el valor óptimo necesario para optimizar la conversión, se realizan varios experimentos a 40 °C, con una relación volumétrica aceite/etanol 12/3.5 y a pH 11, en los que se va aumentando progresivamente el contenido en lipasa inmovilizada, desde un 0,1 % a un 1 % con respecto al peso de aceite empleado. Los datos obtenidos se recogen en la **Figura 5.6**.

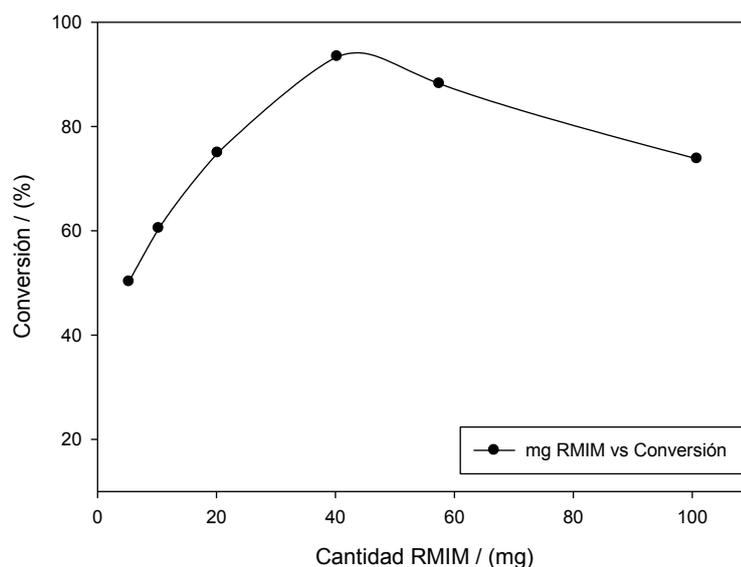


Figura 5.6. Datos de la influencia del contenido de lipasa inmovilizada en la conversión.

Puede observarse un máximo para la conversión con un contenido de lipasa inmovilizada de 40 - 45 mg aproximadamente, lo que coincide con un 0.5 % en peso con respecto al aceite utilizado en las reacciones.

Se produce un aumento prácticamente lineal de la conversión con el contenido creciente de lipasa inmovilizada hasta el valor máximo de 40 mg, a partir del cual se produce un descenso en la conversión. Probablemente, este descenso esté provocado por la formación de agregados de partículas del biocatalizador inmovilizado que dificultan la transferencia de masa. Esto se ha observado para algunas de las enzimas estudiadas en forma libre. En teoría, la inmovilización debería evitar este problema, pero como puede deducirse de los datos, probablemente existe algún mecanismo que provoca la disminución de la conversión, y parece que la explicación más lógica sea la formación de agregados, que dificulten la transferencia de masa y por tanto el acceso de los sustratos al sitio activo de la enzima.

5.2.3

INFLUENCIA DEL CONTENIDO EN AGUA

A fin de evaluar como influye la cantidad de agua presente en el medio de reacción sobre la conversión, se han llevado a cabo una serie de experimentos en los que se han utilizado una temperatura de 40 °C, pH 11, relación aceite/etanol 12/3.5 y 40 mg de lipasa inmovilizada. En cada experimento se ha ido aumentando el contenido en agua por adición de agua desionizada, y los datos obtenidos se muestran en la **Tabla 5.8**, y en la **Figura 5.7**.

Tabla 5.8. Datos de la influencia del contenido en agua del medio de reacción para la lipasa inmovilizada comercial Lipozyme RM IM, para reacciones llevadas a cabo a pH 11, relación aceite/etanol 12/3.5, 40 °C y 40 mg de lipasa inmovilizada.

Contenido en agua (%)	Conversión (%)	FAEE (%)	MG+DG (%)	TG (%)	Viscosidad cinemática (mm²/s)
0.0	92.5	59.8	18.7	21.5	8.3
0.05	89.6	60.1	15.2	24.7	8.6
0.10	84.5	58.7	18.1	23.2	8.8
0.16	81.2	58.1	19.3	22.6	9.7
0.22	62.8	49.2	12.5	38.3	10.5
0.27	32.3	30.1	8.3	61.6	14.2

Puede verse como el contenido en agua adicionada al medio de reacción provoca desde el inicio un descenso en la conversión para esta lipasa. Como es de esperar, puede observarse en la **Figura 5.7** un aumento casi exponencial de la viscosidad cinemática con el contenido en agua del medio de reacción.

Es de destacar que en este caso, la tolerancia al contenido de agua en el medio es algo mayor que para las lipasas en forma libre, lo cual puede ser debido al soporte, que al ser de tipo iónico retenga agua sin afectar de una manera muy acusada, al menos inicialmente, a la enzima.

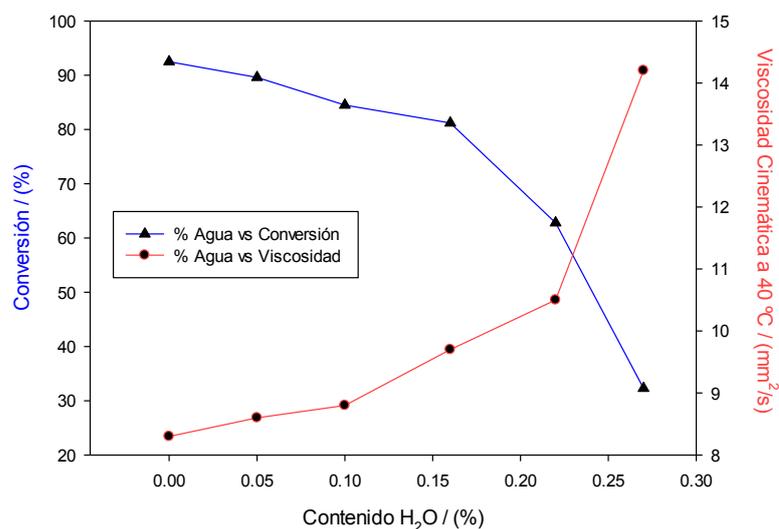


Figura 5.7. Datos de la influencia del contenido de agua en el medio de reacción sobre la conversión.

5.2.4

REUTILIZACIÓN DE LA ENZIMA INMOVILIZADA

Para estudiar la posibilidad de reutilización de la lipasa Lipozyme RM IM en la reacción de transesterificación de aceite de girasol con etanol absoluto, se realizaron experimentos con reacciones sucesivas llevadas a cabo en condiciones estándar, a pH 11, relación aceite/etanol 12/3.5, 40 °C, 40 mg de lipasa inmovilizada y sin agua añadida al medio de reacción.

Previamente a la reutilización de la enzima, ésta se somete a un lavado con una disolución 100 mM de tampón fosfato a pH 8, y se seca en desecador durante 2 horas. Tras el lavado y secado de la lipasa inmovilizada, ésta se vuelve a utilizar en una nueva reacción determinándose las conversiones y composición de la mezcla resultante. Los datos se encuentran recogidos en la **Tabla 5.9**.

Tabla 5.9. Datos de reutilización de la lipasa inmovilizada comercial Lipozyme RM IM, para reacciones llevadas a cabo a pH 11, relación aceite/etanol 12/3.5, 40 °C, 40 mg de lipasa inmovilizada y sin agua añadida al medio de reacción.

Nº Uso	Conversión (%)	FAEE (%)	MG+DG (%)	TG (%)	Viscosidad cinemática (mm²/s)
1	98.6	61.7	26.9	11.4	8.3
2	87.0	60.3	14.4	25.4	8.6
3	83.2	59.5	21.6	18.9	8.7
4	81.5	60.9	19.6	19.5	8.7
5	69.8	53.1	14.3	32.6	8.9
6	58.6	46.8	9.3	43.9	9.4
7	40.9	38.2	10.1	51.6	11.4
8	34.7	33.8	11.3	54.9	14.1
9	31.2	29.6	8.7	61.7	14.5
10	30.9	28.2	8.4	63.4	16.1

De la misma manera, puede observarse en la **Figura 5.8**, como se produce un descenso inicial en la conversión que parece estabilizarse hasta el cuarto uso, para posteriormente seguir descendiendo de manera casi lineal hasta el séptimo uso. Después del séptimo uso se observa una tendencia a la estabilización a valores ya muy bajos de conversión, del orden del 20 %, donde parece mantenerse una actividad residual.

Puede también apreciarse en la **Figura 5.8**, como a partir del sexto uso, la viscosidad cinemática sufre un aumento exponencial, lo que limita la utilización de la lipasa más allá de seis veces consecutivas.

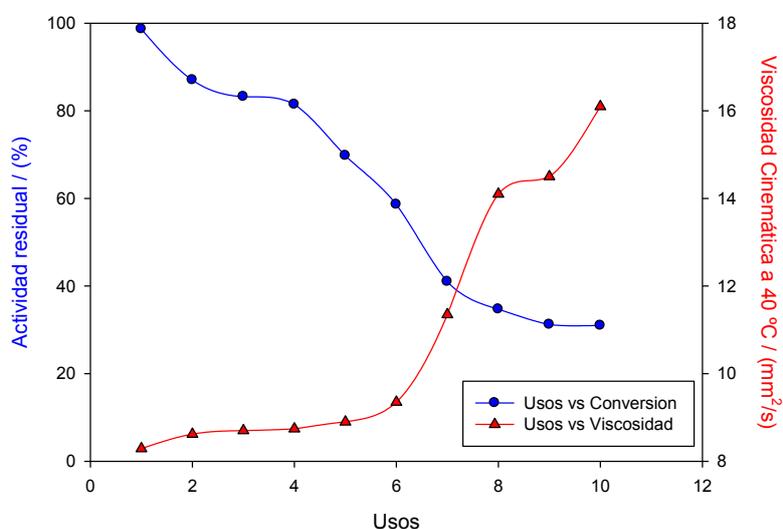


Figura 5.8. Datos de actividad residual obtenidos al reutilizar la enzima tras un lavado.

Comparando con los resultados de la **Figura 5.4** podemos concluir que las lipasas inmovilizadas de forma covalente mantienen mejor la actividad que la lipasa comercial estudiada, que sufre un proceso de desactivación muy similar al experimentado por la sepiolita desmineralizada.

6.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Tras haber realizado una discusión separada y pormenorizada de los resultados obtenidos tanto para las lipasas en forma libre como inmovilizadas, en el presente Capítulo se aborda una discusión general de los resultados obtenidos en este estudio, en relación a las posibilidades de aplicación de métodos enzimáticos a la producción de biocombustibles.

Los estudios realizados han podido confirmar que diversas lipasas comerciales (Lipopan 50 BG[®], Biolipasa R[®] y Lipozyme RM IM[®]), permiten su aplicación a la producción de biocombustibles que integren la glicerina como monoglicéridos, aprovechando el carácter 1,3 selectivo de estas lipasas. Ello requiere determinar específicamente para cada una de ellas las condiciones de operación y variables más influyentes en la reacción de transesterificación selectiva biocatalizada. Asimismo, se ha podido comprobar que todas estas lipasas en principio son susceptibles de ser utilizadas en forma inmovilizada. Así, una vez estudiadas las enzimas en forma libre (a excepción de la Lipozyme RM IM que es una enzima inmovilizada comercial) y tras evaluar los resultados obtenidos operando en las condiciones idóneas de operación de cada una de ellas, se ha considerado que la Biolipasa R es, la que operativamente es más adecuada, por lo que también se ha llevado a cabo su evaluación tras su inmovilización mediante diferentes procedimientos.

En cuanto a los resultados más relevantes obtenidos en los estudios realizados con las diferentes lipasas podemos destacar que, en lo que se refiere a la PPL, se ha encontrado que la enzima funciona mejor cuando se emplea un gran exceso de etanol en el medio, concretamente ha arrojado los mejores resultados de conversión con una relación volumétrica aceite/etanol 2/1. Asimismo, esta enzima opera de forma óptima a 40 °C, pH 12 y tiempos de reacción relativamente cortos, entre 30 minutos a una hora, con pesos de lipasa de aproximadamente del 0.4 % en peso con respecto al peso de aceite utilizado y sin adicionar agua al medio de reacción.

Se ha estudiado también la influencia de la utilización de disoluciones acuosas de NaOH de diferentes concentraciones para el ajuste del pH, todo ello para diferentes relaciones aceite/etanol. Este estudio se ha llevado a cabo con la idea de evaluar si existe influencia de la concentración iónica efectiva del medio, para ello se han usado diferentes concentraciones de NaOH y diferentes contenidos de etanol. Como se ha podido observar en los resultados que se muestran en la **Figura 4.5**, existe una gran influencia del contenido salino del medio, no solo del pH, ya que se han usado diferentes concentraciones de NaOH que han permitido obtener el mismo pH en el medio pero con distinta concentración iónica efectiva. Esta observación ha sido publicada en la revista *Bioresource Technology*, debido a que ha sido la primera referencia a este comportamiento encontrada en la producción de biodiesel mediante el uso de lipasas.

En cuanto a la enzima Biolipasa R, se ha evaluado su comportamiento ante la transesterificación de aceite de girasol con etanol, encontrándose que opera de forma óptima con un contenido de agua del medio de reacción del 0.15 %, un 0.05 - 0.1 % en peso de lipasa con respecto al peso de aceite utilizado, 20 °C, relación aceite/etanol 12/3.5 y pH 12 (por adición de 75 µl de NaOH 10 N).

Se ha conseguido explicar el comportamiento del sistema, en cuanto a conversión y contenido en FAEE, mediante un modelo estadístico que correlaciona estas variables de salida con las variables de reacción (T^a , pH y relación aceite/etanol), encontrándose unos coeficientes de correlación entre los valores experimentales y calculados de 91.6 y 90.1 % para conversión y contenido en FAEE respectivamente. Por tanto, es posible predecir el comportamiento del sistema en los intervalos estudiados para las variables de reacción, así como obtener información sobre las condiciones óptimas de operación de esta enzima para la producción de biodiesel mediante el procedimiento estudiado. Todo ello se ha corroborado realizando experimentos de validación del modelo, cuyos resultados se han presentado anteriormente, y que vienen a confirmar la consistencia del modelo.

En lo que se refiere a la enzima Lipopan 50 BG, tras evaluar su comportamiento, se ha encontrado que esta enzima trabaja de forma óptima a una temperatura de 20 °C, en torno al 0.16 % de agua en el medio de reacción, 0.3 % en peso de lipasa con respecto al de aceite, relación aceite/etanol 12/3.5 y pH 12. En este caso se ha encontrado en cambio que el factor temperatura no es estadísticamente significativo en el rango de estudio. En este caso, el modelo estadístico de correlación creado, ha resultado en unos valores de coeficientes de correlación entre los datos experimentales y calculados de 81.8, 85.4 y 79.3 % para conversión, contenido en FAEE y viscosidad cinemática, respectivamente. Por tanto, se puede decir que existe una correlación adecuada para las variables de salida conversión y contenido en FAEE, siendo insuficiente en el caso de la viscosidad cinemática. Por ello, se puede predecir el comportamiento del sistema en cuanto a conversión y contenido en FAEE dentro el rango de estudio, de acuerdo con los experimentos de validación correspondientes.

Se puede decir, haciendo una comparativa entre las tres lipasas operando en forma libre, que la Biolipasa R es la que opera en unas condiciones más suaves y rinde conversiones del orden del 90 %, similares a las obtenidas con la PPL con unas condiciones más “severas”, o sea, mayor exceso de etanol y mayor temperatura. Mientras que el comportamiento de la enzima Lipopan 50 BG se encuentra en un punto intermedio entre el de la PPL y la Biolipasa R.

Por ello, se ha seleccionado la Biolipasa R como la más idónea para llevar a cabo el proceso de inmovilización mediante diferentes procedimientos, ya que opera a baja temperatura, con relativamente poco exceso de etanol y con tiempos de reacción cortos.

Los resultados obtenidos en lo que respecta a la síntesis y caracterización de los soportes para la inmovilización de las lipasas seleccionadas son en ambos casos satisfactorios, presentando comportamientos diferenciados los sistemas biocatalíticos resultantes tras la inmovilización de la lipasa seleccionada. Así tras evaluar la actividad catalítica de cada uno de los sistemas heterogéneos sintetizados con la Biolipasa R, los

resultados presentados previamente en las **Tablas 5.3 y 5.4**, ponen de manifiesto la importancia del pH de operación y del método de inmovilización. Así, cuando se emplea p-hidroxibenzaldehído como activante, se observa una influencia muy importante del pH de operación en el proceso de inmovilización, de forma que a pH 7 se consigue fijar el 79.7 % de la lipasa, frente al 20.0 % que se obtiene a pH 9. No obstante, la calidad de la lipasa inmovilizada a pH 7 es claramente menor que la obtenida a pH 9, donde la actividad residual, E_{res} , y específica, E_{spe} , de las enzimas inmovilizadas son muy superiores.

Al operar con un *linker* de mayor tamaño, como en el caso de 4-aminobencilamina unida a aldehído tereftálico, sucede de manera inversa, obteniéndose mayor cantidad de lipasa inmovilizada al operar a mayor pH, también con mayor actividad residual, E_{res} , aunque con menor actividad específica, E_{spe} . Es decir, en este caso la lipasa inmovilizada funciona de manera menos eficiente que la libre.

La comparación entre ambos sistemas de activación parece aconsejar el empleo de p-hidroxibenzaldehído como agente activante del sólido inorgánico, operando a pH 9. Además, este método es comparativamente más simple, pues la activación se lleva a cabo en un solo paso, frente a los dos necesarios con el proceso que emplea 4-aminobencilamina más aldehído tereftálico.

En lo que respecta a los resultados obtenidos con la Biolipasa R inmovilizada por retención física en sepiolita, sometida a un tratamiento de desmineralización ácida y sin desmineralización, los resultados recogidos en las **Tablas 5.5 y 5.6** ponen de manifiesto que el tratamiento de desmineralización es imprescindible para incrementar de forma notable la capacidad de inmovilización del soporte sepiolita. Además, con la sepiolita desmineralizada, los valores de todos los parámetros evaluados, porcentaje de enzima inmovilizada, E_{inm} actividad residual, E_{res} , y actividad específica, E_{spe} , presentan resultados algo mejores que los obtenidos con la inmovilización covalente sobre el soporte $AlPO_4$ /Sepiolita, por cualquiera de los dos métodos investigados. Por tanto se puede concluir que mediante la retención física de las lipasas estudiadas, llevada a cabo en sepiolita previamente

desmineralizada y operando a pH 9, se obtienen los mejores resultados de actividad para la lipasa inmovilizada.

Si se comparan globalmente ambos procesos de inmovilización, o sea tras los usos sucesivos, mediante la unión covalente y por retención física, pueden destacarse interesantes conclusiones, tal como puede extraerse de la **Figura 5.4**. El sistema inmovilizado mediante un *linker*, es mucho más estable que el sistema por retención física, obteniéndose valores de actividad residual estables y muy cercanos al 100 % hasta aproximadamente el quinto uso. Sin embargo, el sistema inmovilizado por retención física presenta una pérdida de actividad residual mucho más acusada, probablemente debida a la lixiviación de la enzima, tal como ha podido comprobarse por la presencia de proteínas en el producto de reacción (ensayo positivo de Biuret), lo que no ocurre en el sistema covalente, donde se puede atribuir el descenso de actividad a una desactivación de las enzimas.

En lo que respecta al comportamiento de los sistemas inmovilizados respecto a las enzimas en forma libre, se puede obtener a partir de la comparación entre los sistemas que usan Biolipasa R en forma libre y los que usan Biolipasa R inmovilizada, ya sea físicamente o covalentemente. Según los valores recogidos en las **Tablas 4.1 y 5.7**, donde se presentan datos de reacciones con Biolipasa R en forma libre e inmovilizada respectivamente, se puede ver como en la **Tabla 5.7** para el primer uso (30 °C, relación aceite/etanol 12/3.5 y pH 11), que se obtienen conversiones del 84.3 % y 90.2 % para el sistema covalente y por retención física respectivamente. Si se compara con una reacción en las mismas condiciones o condiciones similares pero con la lipasa en forma libre, se encuentran conversiones en torno al 80 %, por lo que se puede concluir que a priori, el sistema inmovilizado y utilizado una sola vez, presenta resultados prácticamente idénticos a utilizar la lipasa en forma libre. Estos resultados se mantienen hasta aproximadamente el cuarto o quinto uso en el caso del sistema inmovilizado covalentemente a través de un *linker* con p-hidroxibenzaldehído, en cambio, desciende más rápidamente en el caso de soporte por retención física, encontrándose ya en el quinto uso tan solo un 60 % de conversión.

Por tanto, puede considerarse que el sistema de inmovilización covalente a través de la formación de un *linker* con p-hidroxibenzaldehído, es un método de inmovilización perfectamente útil en la producción de este tipo de biocombustible.

También resulta interesante la comparación de los resultados obtenidos con las lipasas inmovilizadas aplicando la tecnología descrita, y una lipasa inmovilizada comercial, Lipozyme RM IM, de donde se pueden hacer importantes deducciones. Esta enzima presenta valores de conversiones comparables al sistema inmovilizado a través de un *linker*, de entre 80 – 90 %, pero con la diferencia de que en la enzima comercial inmovilizada se produce un descenso de la actividad con los usos mucho más notable y acusado que en el caso del *linker* con p-hidroxibenzaldehído, y a su vez comparable con el sistema por retención física en sepiolita desmineralizada, tal como puede verse en las **Figuras 5.4 y 5.8**. Este comportamiento es comprensible, ya que la enzima comercial, al igual que el sistema obtenido con sepiolita, es un sistema en el que la lipasa es retenida por retención física, en el que el soporte está constituido por una resina de intercambio iónico. De hecho, la curva de desactivación con los usos de ambos sistemas retenidos físicamente, presenta un perfil similar, con una disminución de la actividad con los usos continua y más o menos acusada desde el inicio de su utilización, mientras que en el sistema inmovilizado covalentemente, se observa un perfil totalmente distinto, con un periodo inicial donde la enzima permanece bastante estable antes de empezar a observarse una pérdida de actividad importante.

Para la reacción llevado a cabo usando grasa de origen animal (Prolongo) y la lipasa LR inmovilizada covalentemente con p-hidroxibenzaldehído, al final del proceso, se ha reducido la viscosidad inicial de la materia prima (38 mm²/s) hasta un valor de 6.3 mm²/s, lo cual la hace perfectamente utilizable en mezclas de alto contenido con diesel convencional, permitiendo así dar salida a este tipo de residuos. El biocombustible finalmente obtenido presenta una acidez de 0.1°, mucho más baja en comparación a la acidez de la materia prima inicial (5.1°).

En la **Figura 6.1** pueden verse de izquierda a derecha, la materia prima inicial, el resultado de la reacción de esterificación con ácido sulfúrico y metanol, y el resultado tras la reacción de transesterificación con la lipasa inmovilizada.



Figura 6.1. De izquierda a derecha, grasa animal (Prolongo), resultado de la esterificación con H_2SO_4 y metanol y resultado de la transesterificación con etanol y lipasa inmovilizada covalentemente con p-hidroxibenzaldehído.

7.

CONCLUSIONS

The results obtained during the development of the research presented in this report, produce findings which are detailed below:

- ✓ Reaction Conditions have been optimized to make possible the transesterification reaction with sunflower oil and ethanol, by using the lipases Biolipasa R, Lipopan 50 BG, PPL and Lipozyme RM IM.
- ✓ Statistical models have been obtained with sufficient accuracy to explain, in most cases, the variability in the conversion, FAEE content and kinematic viscosity.
- ✓ The influence of water content in the reaction medium for all the lipases studied has been studied, yielding different results that generally, allow to obtain an optimal water content in the reaction medium.
- ✓ It has succeeded in obtaining a new biofuel that integrates the glycerin in the composition as mono and diglycerides, avoiding the generation of glycerol and thus its necessary removal.
- ✓ It has been successfully carried out the immobilization of a commercially available lipase (Biolipasa R), by physical retention in a sepiolite and covalently via a linker with p-hydroxybenzaldehyde and benzylamine-terephthalic aldehyde, respectively.
- ✓ Biofuel has been obtained without free glycerol content, from low quality raw materials from animal waste.

- ✓ It has been successfully carried out the transesterification reaction with animal fat from butchery waste, using covalently immobilized Biolipasa R with p-hydroxybenzaldehyde.

8.

REFERENCES

- [1] **Corma A, Huber GW, Sauvanaud L, O'Connor P.** Processing biomass-derived oxygenates in the oil refinery: Catalytic cracking (FCC) reaction pathways and role of catalyst. *J. Cat.*, 247 (2007) 307-327.
- [2] **Mittelbach M, Remschmidt C.** Biodiesel - The Comprehensive Handbook. Editor M. Mittelbach, Graz, Austria, 2004.
- [3] **ORDEN ITC/2877/2008**, de 9 de octubre, por la que se establece un mecanismo de fomento del uso de biocarburantes y otros combustibles renovables con fines de transporte. **BOE nº 248, 14 octubre 2008.**
- [4] **Behr A, Eilting J, Leschinski J, Lindner F.** Improved utilisation of renewable resources: New important derivatives of glycerol. *Green Chem.*, 10 (2008) 13-30.
- [5] **Lurgi.** Biodiesel from Renewable Resources.
http://www.lurgilifescience.com/lurgi_ls/english/nbsp/menu/media/brochures/biodiesel_en.pdf
- [6] **Lurgi.** Fatty Acid Technology.
http://www.lurgilifescience.com/lurgi_ls/english/nbsp/menu/media/brochures/fatty_acid.pdf
- [7] **Claire S. MacLeoda, Adam P. Harvey, Adam F. Lee, Karen Wilson.** Evaluation of the activity and stability of alkali-doped metal oxide catalysts for application to an intensified method of biodiesel production. *Chem. Eng. J.*, 135 (2008) 63-70.
- [8] **Kulkarni MG, Gopinath R, Meher LC, Dalai AK.** Solid acid catalyzed biodiesel production by simultaneous esterification and transesterification. *Green Chem.*, 8 (2006) 1056-1062.

- [9] **Wu WH, Foglia TA, Marmer WN, Phillips J.** Optimizing production of ethyl esters of grease using 95% ethanol by response surface methodology. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 76 (1999) 517-521.
- [10] **Iso M, Chen B, Eguchi M, Kudo T, Sherestha S.** Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic.*, 16 (2001) 53-58.
- [11] **Ranganathan SV, Narasimhan SL, Muthukumar K.** An overview of enzymatic production of biodiesel. *Biores. Tech.*, 99 (2008) 3975-81.
- [12] **Kaieda M, Samukawa T, Kondo A, Fukuda H.** Effect of methanol and water contents on production of biodiesel fuel from plant oil catalyzed by various lipases in a solvent-free system. *J. Biosci. Bioeng.*, 91 (2001) 12-5.
- [13] **Shah S, Gupta MN.** Lipase catalyzed preparation of biodiesel from Jatropha oil in a solvent free system. *Process Biochem.*, 42 (2007) 409-14.
- [14] **Al-Zuhair S, Ling FW, Jun LS.** Proposed kinetic mechanism of the production of biodiesel from palm oil using lipase. *Process Biochem.*, 42 (2007) 951-60.
- [15] **Salis A, Monduzzi M, Solinas V.** Use of lipases for the production of biodiesel. In: Polaina J, MacCabe AP, editors. *Industrial enzymes. Structure, function and applications.* Amsterdam: Springer Netherlands; p. 317-39; 2007.
- [16] **Royon D, Daz M, Ellenrieder G, Locatelli S.** Enzymatic production of biodiesel from cotton seed oil using t-butanol as a solvent. *Biores. Tech.*, 98 (2007) 648-53.
- [17] **Watanabe Y, Shimada Y, Sugihara A, Noda H, Fukuda H, Tominaga Y.** Continuous production of biodiesel fuel from vegetable oil using immobilized *Candida antarctica* lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 77 (2000) 355-60.
- [18] **Hsu AF, Jones K, Foglia TA, Marmer WN.** Immobilized lipase-catalyzed production of alkyl esters of restaurant grease as biodiesel. *Biotech. Appl. Biochem.*, 36 (2002) 181-6.

- [19] **Macario A, Giordano G, Setti L, Parise A, Campelo JM, Marinas JM, Luna D.** Study of lipase immobilization on zeolitic support and transesterification in solvent free-system. *Biocat. Biotrans.*, 25 (2007) 328-35.
- [20] **Mittelbach M, Remschmidt C.** Biodiesel: the comprehensive handbook. *Second ed. Boersedruck Ges. M. B. H., Vienna, Austria, (2005).*
- [21] **Knothe G., Krahl J., Van Gerpen J.,** The Biodiesel Handbook. *AOCS PRESS. Champaign, IL, (2005).*
- [22] **Luna D, Bautista FM, Caballero V, Campelo JM, Marinas JM, Romero AA.** Method for producing biodiesel using porcine pancreatic lipase as an enzymatic biocatalyst. *Patent No. 07803637.3-1521 PCT/ES 2007/000450. 2009.*
- [23] **Caballero V, Bautista FM, Campelo JM, Luna D, Marinas JM, Romero AA, Hidalgo JM, Luque, R, Macario A, Giordano G.** Sustainable preparation of a novel glycerol-free biofuel by using pig pancreatic lipase: Partial 1,3-regiospecific alcoholysis of sunflower oil. *Process Biochem.*, 44 (2009) 334-342.
- [24] **Fabrizi D, Bevoni V, Notari M, Rivetti F.** Properties of a potential biofuel obtained from soybean oil by transmethylation with dimethyl carbonate. *Fuel*, 86 (2007) 690-697.
- [25] **Notari M, Rivetti F.** Use of a mixture of esters of fatty acids as fuel or solvent. *Patent No. WO2004/052874 to Polimeri Europa. 2004.*
- [26] **Kijeński J, Lipkowski A, Walisiewicz-Niedbalska W, Gwardiak H, Roalsyczki K, Pawlak I.** A biofuel for compression-ignition engines and a method for preparing the biofuel. *European Patent EP1580255. 2004.*
- [27] **Xu Y, Du W, Liu D.** Study on the kinetics of enzymatic interesterification of triglycerides for biodiesel production with methyl acetate as the acyl acceptor. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic.*, 32 (2005) 241-245.

- [28] **Modi MK, Reddy JRC, Rao BVSK, Prasad RBN.** Lipase-mediated conversion of vegetable oils into biodiesel using ethyl acetate as acyl acceptor. *Biores. Technol.*, 98 (2007) 1260-1264.
- [29] **Bornscheuer UT.** Lipase-catalyzed synthesis of monoacylglycerols. *Enzyme Microb. Tech.*, 17 (1995) 578-586.
- [30] **Li W, Du W, Liu D.** *Rhizopus oryzae* Whole-Cell-Catalyzed Biodiesel Production from Oleic Acid in tert-Butanol Medium. *Energy Fuels*, 22 (2008) 155-158.
- [31] **Du W, Xu Y, Liu D, Li Z.** Study on acyl migration in immobilized lipozyme TL catalyzed transesterification of soybean oil for biodiesel production. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic*, 37 (2005) 68-71.
- [32] **Koshland Jr. DE.** The Key-Lock Theory and the Induced Fit Theory. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 33 (1994) 2375-2378.
- [33] **Koshland DE, Neet KE.** The Catalytic and Regulatory Properties of Enzymes. *Ann. Rev. Biochem.*, 37 (1968) 359-411.
- [34] **Tischer W, Wedekind F.** Immobilized Enzymes: Methods and Applications. *Topics in Current Chem.*, 200 (1999) 96-126.
- [35] **Cao L, van Langeny L, Sheldon RA.** Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier-free? *Current Op. Biotech.*, 14 (2003) 387-394.
- [36] **Bickerstaff GF.** Immobilization of Enzymes and Cells. *Ed. Humana Press, (Totowa, New Jersey, EEUU) 1997.*
- [37] **Bornscheuer UT, Bessler C, Srinivas R, Krishna SH.** Optimizing lipases and related enzymes for efficient application. *Trends in Biotech.*, 20 (2002) 433-437.
- [38] **Svendsen A.** Lipase protein engineering (rev). *Biochim. Biophys Acta*, 1543 (2000) 223-238.
- [39] **Bloom JD, Meyer MM, Meinhold P, Otey CR, MacMillan D, Arnold FH.** Evolving strategies for enzyme engineering. *Current Op. in Struct. Biology*, 15 (2005) 447-452.

- [40] **Ballesteros A, Bornscheuer U, Capewell A, Combes D, Condoret JS, Koenig K, Kolisis FN, Marty A, Menge U, Scheper T, Stamatis H, Xenakis A.** Enzymes in Non-Conventional Phases. *Biocat. Biotransf.*, 13 (1995) 1-42.
- [41] **Haas HJ, Scott KM.** Diesel fuel as a solvent for the lipase-catalyzed alcoholysis of triglycerides and phosphatidylcholine. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 73 (1996) 1497-1504.
- [42] **Park S, Kazlauskas, RJ.** Biocatalysis in ionic liquids, advantages beyond green technology. *Current Op. Biotech.*, 14 (2003) 432-437.
- [43] **Schomburg I, Chang A, Ebeling C, Gremse M, Heldt C, Huhn G, Schomburg D. Brenda.** The enzyme database: updates and major new developments. *Nucleic Acids Res.*, 32 (2004) 431-433.
- [44] **Faber, K.** Biotransformations in Organic chemistry. (Faber, K. Ed.) *Spriger-Verlag, Heidelberg.* 2004.
- [45] **Carrea G, Ottolina G, Riva S.** Role of solvents in the control of enzyme selectivity in organic media, 16. G. Carrea, G. Ottolina and S. Riva. *Trends Biotech.*, 13 (1995) 63-70.
- [46] **Klibanov AM.** Enzymatic catalysis in anhydrous organic solvents. *Trends Biochem. Sci.*, 14 (1989) 141-144.
- [47] **Klibanov AM.** Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature*, 409 (2001) 241-246.
- [48] **Khmelnitsky YL, and Rich JO.** Biocatalysis in nonaqueous solvents, *Current Op. Chem. Bio.*, 3 (1999) 47-53.
- [49] **Yang Z, Pan W.** Ionic liquids: Green solvents for nonaqueous biocatalysis, a Review. *Enz. Microb. Tech.*, 37 (2005) 19-28.
- [50] **Zaks A, Klibanov AM.** Enzymatic catalysis in organic media at 100 °C. *Science*, 224 (1984) 1249-1251.
- [51] **Zale SE, Klibanov AM.** Why does ribonuclease irreversibly inactivate at high temperatures? *Biochemistry*, 25 (1986) 5432-5444.
- [52] **Ke T, Klibanov AM.** Markedly Enhancing Enzymatic Enantioselectivity in Organic Solvents by Forming Substrate Salts. *J. A. Chem. Soc.*, 121 (1999) 3334-3340.

- [53] **Desai UR, Klibanov AM.** Assessing the Structural Integrity of a Lyophilized Protein in Organic Solvents. *J. A. Chem. Soc.*, 117 (1995) 3940-3945.
- [54] **Al-Zuhair S, Jayaraman KV, Krishnan S, Chan WH.** The effect of fatty acid concentration and water content on the production of biodiesel by lipase. *Biochem. Eng. J.*, 30 (2006) 212-217.
- [55] **Wehtje E, Adlercreutz P.** Water activity and substrate concentration effects on lipase activity. *Biotech. Bioeng.*, 55 (1997) 798-806.
- [56] **Salis A, Pinna M, Monduzzi M, Solinas VJ.** Biodiesel production from triolein and short chain alcohols through biocatalysis. *Biotechnology*, 119 (2005) 291-299.
- [57] **Hsu A, Jones K, Foglia TA, Marmer WN.** Immobilized Lipase-Catalysed Production of Alkyl Esters of Restaurant Grease as Biodiesel. *Biotech. Appl. Biochem.*, 36 (2002) 181-186.
- [58] **Zaks A, Klibanov AM.** Enzyme-catalyzed processes in organic solvents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82 (1985) 3192-3196.
- [59] **Zaks A, Klibanov AM.** Enzymatic Catalysis in Nonaqueous Solvents. *J. Biologic. Chem.*, 263 (1988) 3194-3201.
- [60] **Roy I, Gupta MN.** Freeze drying of proteins: some emerging concerns. *Biotech. Appl. Biochem.*, 39 (2004) 165-177.
- [61] **Lee MY, Dordick JS.** Enzyme activation for nonaqueous media. *Current. Op. Biotech.*, 13 (2002) 376-384.
- [62] **Margolin AL, Navia MN.** Protein Crystals as Novel Catalytic Materials. *Ang. Chem. Int. Ed.*, 40 (2001) 2204-2222.
- [63] **Matsushima A, Kodera Y, Hiroto M, Nishimura H, Inada I.** Bioconjugates of proteins and polyethylene glycol: potent tools in biotechnological processes. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic*, 2 (1996) 1-17.
- [64] **Bovara R, Carrea G, Gioacchini AM, Riva S, Secundo F.** Activity, Stability, and Conformation of Methoxypoly(Ethylene Glycol)-Subtilisin at Different Concentrations of Water in Dioxane. *Biotech. Bioeng.*, 54 (1997) 50-57.

- [65] **Carrea G, Ottolina G, Riva S.** Role of solvents in the control of enzyme selectivity in organic media. *Trends. Biotech.*, 13 (1995) 63-70.
- [66] **Wingard L.B.** Enzyme Engineering. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, Ed. Interscience Publishers, New York. 1972.
- [67] **Brady D, Jordaan AJ.** Advances in enzyme immobilisation. *Biotech. Lett.*, 31 (2009) 1639-1650.
- [68] **Betancor L, Lopez-Gallego F, Hidalgo A, Alonso-Morales N, Dellamora-Ortiz G, Fernandez-Lafuente R, Guisan JM.** Different mechanisms of protein immobilization on glutaraldehyde activated supports: Effect of support activation and immobilization conditions. *Enz. Microb. Tech.*, 39 (2006) 877-882.
- [69] **Tanaka A, Tosa T, Kobayashi T.** "Bioprocess Technology, Vol. 16: Industrial Application of Immobilized Biocatalysts", Marcel Dekker, New York. 1993.
- [70] **Sheldon RA.** Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance *Adv. Synth. Cat.*, 349 (2007) 8-9, 1289-1307.
- [71] **Worsfold PJ.** Classification and chemical characteristics of immobilized enzymes. *Pure Appl. Chem.*, 4 (1995) 597-600.
- [72] **Salis A, Meloni D, Ligas S, Casula M, Monduzzi M, Solinas V, Dumitriu E.** Physical and chemical adsorption of *Mucor javanicus* lipase on SBA-15 mesoporous silica. Synthesis, structural characterization, and activity performance. *Langmuir*, 21 (2005) 5511-5516.
- [73] **Reetz MT.** Entrapment of biocatalysts in hydrophobic sol-gel materials for use in organic chemistry. *Adv. Mater.*, 9 (1997) 943-954.
- [74] **Díaz JF, Balkus Jr KJ.** Enzyme immobilization in MCM-41 molecular sieve. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic.*, 2 (1996) 115-126.
- [75] **Macario A, Giordano G, Setti L, Parise A, Campelo JM, Marinas JM, Luna D.** Study of lipase immobilization on zeolitic support and transesterification reaction in a solvent free-system. *Biocat. Biotrans.*, 25 (2007) 328-335.

- [76] **St Clair NL, Navia MN.** Cross-linked enzyme crystals as robust biocatalysts, *J. A. Chem. Soc.*, 114 (1992) 7314-7317.
- [77] **Persichetti RA, Lalonde J, Govardhan CP, Khalaf NK, Margolin AL.** *Candida rugosa* lipase-enantioselectivity enhancements in organic-solvents. *Tetrahedron Lett.*, 37 (1996) 6507-6510.
- [78] **Le Carre E, Lewis N, Ribas C, Wells A.** Convenient Preparation of Functionalised Polymer-Based Resins via an Economical Preparation of Chloromethylated Polystyrene Resins (Merrifield Type). *Org. Proc. Res. Dev.*, 4 (2000) 606-610.
- [79] **Delair T, Marguet V, Pichot C, Mandrand B.** Synthesis and characterization of cationic amino functionalized polystyrene latexes. *Colloid & Polimer Sci.*, 272 (1994) 962-970.
- [80] **Cao L.** Immobilised enzymes: science or art? *Current Op. Chem. Bio.*, 9 (2005) 217-226.
- [81] **Clark JH, Macquarrie DJ.** Catalysis of liquid phase organic reactions using chemically modified mesoporous inorganic solids. *Chem. Comm.*, (1998) 853-860.
- [82] **Gaspers PB, Robertson CR, Gast AP.** Enzymes on Immobilized Substrate Surfaces: Diffusion. *Langmuir*, 10 (1994) 2699-2704.
- [83] **Caravajal GS, Leyden DE, Quinting GR, Maciel GE.** Structural characterization of (3-aminopropyl) triethoxysilane-modified silicas by silicon-29 and carbon-13 nuclear magnetic resonance. *Anal. Chem.*, 60 (1988) 1776-1786.
- [83] **Zhang X, Guan RF, Wu DQ, Chan KY.** Enzyme immobilization on amino-functionalized mesostructured cellular foam surfaces, characterization and catalytic properties. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic*, 33 (2005) 43-50.
- [84] **Tanriseven A, Dogan S.** A novel method for the immobilization of β -galactosidase. *Proc. Biochem.*, 38 (2002) 27-30.

- [85] **Nilsson K, Mosbach K.** Peptide synthesis in aqueous-organic solvent mixtures with α -chymotrypsin immobilized to tressyl chloride-activated agarose. *Biotech. Bioeng.*, 26 (1984) 1146-1154.
- [86] **Narinesingh O, Ngo T.** Papain covalently immobilized on fractogel derivative: preparation, bioreactor flow kinetics, and stability. *Biotech. Appl. Biochem.*, 9 (1987) 450-461.
- [87] **Bodalo-Santoyo A, Gomez-Carrasco JL, Gomez-Gomez E, Bastida-Rodríguez J, Máximo-Martín MF, León-Albert G, Hidalgo-Montesinos AM.** Influence of pore size on covalent immobilization of L-aminoacylase on porous glass supports. *An. Quím. Int Ed.*, 94 (1998) 78-83.
- [88] **Guisan RM, Ceinos JM, Blanco RM.** "Procedimiento de Fabricación de Derivados Insolubilizados de Quimotripsina muy Activos y Altamente Estabilizados". *Patente Española 8902176, 1989.*
- [89] **Blanco RM, Guisan JM, Halling P.** Agarose-chymotrypsin as a catalyst for peptide and amino acid ester synthesis in organic media. *Biotech. Lett.*, 11 (1989) 811-816.
- [90] **Bautista FM, Bravo C, Campelo JM, Garcia A, Luna D, Marinas JM.** Covalent immobilization of porcine pancreatic lipase on amorphous $AlPO_4$ and other inorganic supports. *J. Chem. Tech. Biotech.*, 72 (1998) 249-254.
- [91] **Bautista FM, Campelo JM, García A, Jurado A, Luna D, Marinas JM.** Properties of a glucose oxidase covalently immobilized on amorphous $AlPO_4$ support. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic*, 11 (2001) 567-577.
- [92] **Bautista FM, Bravo C, Campelo JM, Garcia A, Luna D, Marinas JM.** Covalent immobilization of acid phosphatase on amorphous $AlPO_4$ support. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic*, 6 (1999) 473-481.
- [93] **Klibanov AM.** Immobilized Enzymes and Cells as Practical Catalysts. *Science*, 219 (1983) 722-727.

- [94] **Mateo C, Palomo JM, Fernandez-Lorente G, Guisan JM, Fernandez-Lafuente R.** Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzym. Microbial Tech.*, 40 (2007) 1451-1463.
- [95] **Klibanov AM, Kaplan NO, Kamen MD.** A rationale for stabilization of oxygen-labile enzymes: application to a clostridial hydrogenase. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 75 (1978) 3640-3643.
- [96] **Reslow M, Adlercreutz P, Mattiasson B.** On the importance of the support material for bioorganic synthesis Influence of water partition between solvent, enzyme and solid support in water-poor reaction media. *Eur. J. Biochem.*, 172 (1988) 573-578.
- [97] **Schmid A, Dordick JS, Hauer B, Kiener A, Wubbolts M.** industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature*, 409 (2001) 258-268.
- [98] **Scouten WH, Luong, JHT, Brown R.S.** Enzyme or protein immobilization techniques for applications in biosensor design. *Trends. Biotech.*, 13 (1995) 178-185.
- [99] **De Man JM.** Principles of Food Chemistry. 3^a Ed, Aspen Publisher. Inc. 1999.
- [100] **Mellor RB, Ronnenberg J, Campbell WH, Diekmann S.** Reduction of nitrate and nitrite in water by immobilized enzymes. *Nature*, 355 (1992) 717-719.
- [101] **Chibata I, Tosa T.** Immobilized microbial cells and their applications. *Trends. Biochem. Sci.*, 5 (1980) 88-90.
- [102] **Bautista FM, Bravo C, Campelo JM, García A, Luna D, Marinas JM.** "Procedimiento de fabricación de productos inorgánicos activados útiles como soportes sólidos para la inmovilización covalente de lipasas y otras enzimas y nuevos productos así obtenidos". Patent Application No. 9601847, 1996.

- [103] **Grillet Y, Llewelyn PL, Tosi-Pellenq N, Rouquerol J.** Adsorption of argon, methane, nitrogen, carbon monoxide and water vapour on sepiolite and AlPO₄-5 as studied by isothermal microcalorimetry. *J. Stud. Sci. Surf. Sci. Catal.*, 80 (1993) 235-242.
- [104] **Ruiz-Hitzky E.** Molecular access to intracrystalline tunnels of sepiolite. *J. Mater. Chem.*, 11 (2001) 86-91.
- [105] **González L, Ibarra L, Rodríguez A, Chamorro CJ.** Preparation of amorphous silica by acid dissolution of sepiolite: kinetic and textural study. *Colloid. Interface Sci.*, 109 (1986) 150-160.
- [106] **Jin S, Qui G, Xiao F, Chang Y, Wan C, Yang M.** Investigation of the structural characterization of mesoporous molecular sieves MCM-41 from sepiolite. *J. Am. Ceram. Soc.*, 90 (2007) 957-61.
- [107] **Cabello JA, Campelo JM, García A, Luna D, Marinas JM.** Knoevenagel condensation in the heterogeneous phase using AlPO₄-Al₂O₃ as a new catalyst *J. Org. Chem.*, 49 (1984) 5195-51-97.
- [108] **Campelo JM, García A, Gutiérrez JM, Luna D, Marinas JM.** Alkali-promoted AlPO₄ catalysts. Acid-base and oxidizing-reducing properties. *J. Colloid Interface Sci.*, 95 (1983) 544-550.
- [109] **Campelo JM, García A, Luna D, Marinas JM.** The effect of the fluoride ion on the catalytic activity of AlPO₄ in the cyclohexene skeletal isomerisation. *J. Cat.*, 102 (1986) 299-308.
- [110] **Campelo JM, Climent MS, Marinas JM.** Alkali-promoted AlPO₄ catalysts II. cyclohexene skeletal isomerization to 1- and 3-methylcyclopentenes. *React. Ket. Cat. Lett.*, 30 (1986) 165-172.
- [111] **Bautista FM, Campelo JM, García A, Guardado R, Luna D, Marinas JM.** AlPO₄-supported nickel catalysts. IX. liquid-phase selective hydrogenation of propargyl alcohols *J. Mol. Cat.*, 125 (1990) 171-186.

- [112] **Bautista FM, Campelo JM, García A, Guardeso R, Luna D, Marinas JM.** Influence of surface support properties on the liquid-phase hydrogenation of propargyl alcohols on AlPO_4 -supported nickel catalysts *J. Mol. Cat.*, 67 (1991) 91-104.
- [113] **Bautista FM, Campelo JM, García A, Guardeso R, Luna D, Marinas JM.** Liquid-phase selective hydrogenation of 1,4-butynediol on supported Ni and Ni-Cu catalysts. "Heterogeneous Catálisis and Fine Chemicals" (M. Guisnet et al. Eds) p 269-276; Elsevier. Amsterdam (1991).
- [114] **Blanco A, Campelo JM, García A, Luna D, Marinas JM, Romero AA.** Alkylation of toluene with methanol over AlPO_4 , $\text{AlPO}_4\text{-Al}_2\text{O}_3$, $\text{AlPO}_4\text{-TiO}_2$, and $\text{AlPO}_4\text{-ZrO}_2$ catalysts. *J. Cat.*, 137 (1992) 51-68.
- [115] **Campelo JM, García A, Luna D, Marinas JM.** Gas-phase measurements of the surface basicity of $\text{AlPO}_4\text{-TiO}_2$ and $\text{AlPO}_4\text{-ZrO}_2$ catalysts. *React. Kinet. Cat. Lett.*, 47 (1992) 263-270.
- [116] **Campelo JM, García A, Luna D, Marinas JM, Romero AA.** $\text{AlPO}_4\text{-Al}_2\text{O}_3$ catalysts with low alumina content. iii. surface basicity of catalysts obtained in aqueous ammonia *Cat. Lett.*, 19 (1993) 137-142.
- [117] **Bautista FM, Campelo JM, García A, Luna D, Marinas JM, Romero AA, Navío JA, Macías. M.** Anion treatment (F^- or SO_4^{2-}) of $\text{AlPO}_4\text{-Al}_2\text{O}_3$ (25 wt.-% Al_2O_3) catalysts. IV. Catalytic performance in the alkylation of phenol with methanol. *Appl. Cat. A.*, 99 (1993) 161-173.
- [118] **Bautista FM, Campelo JM, García A, Luna D, Marinas JM, Romero AA.** $\text{AlPO}_4\text{-Al}_2\text{O}_3$ catalysts with low alumina content. I. Structural and textural characterization of catalysts obtained with aqueous ammonia. *Appl. Cat.*, 96 (1993) 175-199.
- [119] **Bautista FM, Campelo JM, García A, Luna D, Marinas JM, Romero AA.** $\text{AlPO}_4\text{-Al}_2\text{O}_3$ catalysts with low-alumina content. II. Acidity and catalytic activity in cyclohexene conversion and cumene cracking of catalysts obtained with aqueous ammonia *Appl. Cat.*, 104 (1993) 109-135.

- [120] **Bautista FM, Campelo JM, García A, Luna D, Marinas JM, Urbano MR.** Chromium-aluminium orthophosphates. part 1.- structure, texture, surface acidity and catalytic activity in cyclohexene skeletal isomerization and cumene conversion of $\text{CrPO}_4\text{-AlPO}_4$ catalysts. *J. Matter Chem.*, 4 (1994) 311-317.
- [121] **Bautista FM, Campelo JM, García A, Luna D, Marinas JM, Romero AA, Navío JA, Macías M.** Fluoride treatment of $\text{AlPO}_4\text{-Al}_2\text{O}_3$ catalysts. II. poisoning experiments by bases for cyclohexene conversion and cumene cracking. *Cat. Lett.*, 24 (1994) 293-301.
- [122] **Bautista FM, Campelo JM, García A, Luna D, Marinas JM, Romero AA, Navío JA, Macías M. J.** Fluoride and sulfate treatment of $\text{AlPO}_4\text{-Al}_2\text{O}_3$ catalysts. Structure, texture, surface acidity, and catalytic performance in cyclohexene conversion and cumene cracking. *J. Cat.*, 104 (1994) 107-125.
- [123] **Bautista FM, Campelo JM, García A, Luna D, Marinas JM.** AlPO_4 and $\text{AlPO}_4\text{-Al}_2\text{O}_3$ as heterogeneous catalysts in the preparation of 1,3-dioxolanes by acetalization of different carbonyl compounds. *J. Prakt. Chem.* 2, 336 (1994) 620-622.
- [124] **Campelo JM, García A, Herencia JF, Luna D, Marinas JM, Romero AA.** conversion of alcohols (alpha-methylated series) on AlPO_4 catalysts. *J. Cat.*, 151 (1995) 307-314.
- [125] **Bautista FM, Campelo JM, García A, Luna D, Marinas JM, Romero AA, Urbano MR.** Conversion of anisole in the presence of methanol over $\text{AlPO}_4\text{-Al}_2\text{O}_3$ catalysts modified with fluoride and sulfate anions. *React. Kinet. Cat. Lett.*, 54 (1995) 99-106.
- [126] **Brunauer S, Emmett PH, Teller EJ.** Adsorption of Gases in Multimolecular Layers. *J. Am. Chem. Soc.*, 60 (1938) 309-319.
- [127] **Campelo JM, García A, Luna D, Marinas JM.** Acidez superficial de nuevos sistemas de níquel soportado. *Afinidad*, 39 (1982) 61-62.

- [128] **Marinas JM, Jiménez C, Campelo JM, Aramendia MA, Borau V, Luna D.** Valoración espectrofotométrica de bases adsorbidas por diferentes soportes y sistemas metálicos soportados. “7° Simposio Iberoamericano de catálisis” p 79-88. La Plata (Argentina) **1980**.
- [129] **Bautista FM, Campelo JM, García A, Luna D, Marinas JM.** AlPO₄-supported nickel catalysts. VIII. Support effects on the gas-phase dehydrogenation of alkylbenzenes. *J. Cat.*, 107 (**1987**) 181-194.
- [130] **Campelo JM, García A, Luna D, Marinas JM, Martínez MI.** Textural properties, surface chemistry and cyclohexene conversion of AlPO₄-Al₂O₃ catalysts. *Mater. Chem. Phys.*, 21 (**1989**) 409-426.
- [131] **Campelo JM, García A, Luna D, Marinas JM.** Textural properties, surface chemistry and catalytic activity in cyclohexene skeletal isomerization of acid treated natural sepiolites. *Mater. Chem. Phys.*, 24 (**1989**) 51-70.
- [132] **Al-Zuhair S.** Production of **biodiesel** by lipase-catalyzed transesterification of vegetable oils: a kinetics study. *Biotech. Prog.*, 21 (**2005**) 1442-1448.
- [133] **Luna D, Bautista FM, Campelo JM, García A, Llobet A, Marinas JM, Romero I, Romero AA, Serrano I.** Method for the chemical binding of homogeneous catalysts to inorganic solid supports, products thus obtained and applications of same. Patente internacional: PCT/WO 2004/096442, **2004**.
- [134] **Robert O. Kuehl.** Diseño de Experimentos 2a. Editorial Thomson Learning, **2001**.
- [135] **Wei L, Wei D, Dehua L.** Optimization of whole cell-catalyzed methanolysis of soybean oil for biodiesel production using response surface methodology. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic.*, 45 (**2007**) 122-127.
- [136] **Bouaid A, Martinez M, Aracil J.** A comparative study of the production of ethyl esters from vegetable oils as a biodiesel fuel optimization by factorial design. *Chem. Eng. J.*, 134 (**2007**) 93-99.

- [137] **Wang Y, Wu H, Zong MH.** Improvement of biodiesel production by lipozyme TL IM-catalyzed methanolysis using response surface methodology and acyl migration enhancer. *Biores. Tech.*, 99 (2008) 7232-7237.
- [138] **Ghamgui H, Miled N, Rebai A, Karra-chaâbouni M, Gargouri Y.** Production of mono-olein by immobilized *Staphylococcus simulans* lipase in a solvent-free system: Optimization by response surface methodology. *Enz. Microbial Tech.*, 39 (2006) 717-723.
- [139] **Ferella F, Mazziotti G, De Michelis I, Stanisci V, Vegliò F.** Optimization of the transesterification reaction in biodiesel production. *Fuel*, 89 (2010) 36-42.
- [140] **Tat K, Teong K, Rahman A.** A glycerol-free process to produce biodiesel by supercritical methyl acetate technology: An optimization study via Response Surface Methodology. *Biores. Tech.*, 101 (2010) 965-969.
- [141] **Verdugo C, Luque R, Luna D, Hidalgo JM, Posadillo A, Sancho ED, Rodriguez S, Ferreira-Dias S, Bautista F, Romero AA.** A comprehensive study of reaction parameters in the enzymatic production of novel biofuels integrating glycerol into their composition. *Biores. Tech.*, 101 (2010) 6657-6662.
- [142] **Bautista FM, Campelo JM, Garcia A, Luna D, Marinas JM.** Porcine pancreatic lipase-catalyzed enantioselective hydrolysis of n-protected amino acid methyl-esters. *Amino Acids*, 2 (1992) 87-95.
- [143] **Bautista FM, Campelo JM, García A, García E, Luna D, Marinas JM.** Procedimiento para la resolución enzimática de los isómeros óptimamente activos de los esteres metílicos de aminoácidos n-sustituídos. Patente española No. 8903384, Universidad de Córdoba, 1989.
- [144] **Quartey EGK, Hustad JA, Faber K, Anthonsen T.** Selectivity enhancement of PPL-catalyzed resolution by enzyme fractionation and medium engineering: syntheses of both enantiomers of tetrahydropyran-2-methanol. *Enz. Microb. Tech.*, 19 (1996) 361-366.

- [145] **Yu D, Wang L, Gu Q, Chen P, Li Y, Wang Z, Cao S.** A two-step enzymatic resolution of glycidyl butyrate. *Process Biochem.*, 42 (2007) 1319-1325.
- [146] **Benaissi K. Poliakoff M. Thomas NR.** Dynamic kinetic resolution of *rac*-1-phenylethanol in supercritical carbon dioxide. *Green Chem.*, 11 (2009) 617-621.
- [147] **Santaniello E, Ciuffreda P, Casati S, Alessandrini L, Repetto A.** Selective lipase catalyzed preparation of diol monobenzoates by transesterification and alcoholysis reactions in organic solvents. *J. Mol. Cat. B Enzymatic*, 40 (2006) 81-85.
- [148] **Shah S, Sharma S, Gupta MN.** Biodiesel preparation by lipase-catalyzed transesterification of *Jatropha* oil. *Energy Fuels*, 18 (2004) 154-159.
- [149] **Yesiloglu Y.** Immobilized lipase-catalyzed ethanolysis of sunflower oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 81 (2004) 157-60.
- [150] **Yadav GD, Jadhav SR.** Synthesis of reusable lipases by immobilization on hexagonal mesoporous silica and encapsulation in calcium alginate: transesterification in non-aqueous medium. *Micropor. Mesopor. Mater.*, 86 (2005) 215-222.
- [151] **Desai PD, Dave AM, Devi S.** Alcoholysis of salicornia oil using free and covalently bound lipase onto chitosan beads. *Food Chem.*, 95 (2006) 193-199.
- [152] **Li W, Du W, Liu D.** *Rhizopus oryzae* IFO 4697 whole cell catalyzed methanolysis of crude and acidified rapeseed oils for biodiesel production in tert-butanol system. *Process Biochem.*, 42 (2007) 1481-1485.
- [153] **Paula AV, Urioste D, Santos JC, de Castro HF.** Porcine pancreatic lipase immobilized on polysiloxane-polyvinyl alcohol hybrid matrix: catalytic properties and feasibility to mediate synthesis of surfactants and biodiesel. *J. Chem. Tech. Biotech.*, 82 (2007) 281-288.

- [154] **Tuter M, Babali B, Kose O, Dural S, Aksoy HA.** Solvent-free glycerolysis of palm and palm kernel oils catalyzed by a 1,3-specific lipase and fatty acid composition of glycerolysis products. *Biotechnol Lett.*, 21 (1999) 245-248.
- [155] **Rathore V, Madras G.** Synthesis of biodiesel from edible and non-edible oils in supercritical alcohols and enzymatic synthesis in supercritical carbon dioxide. *Fuel*, 86 (2007) 2650-2659.
- [156] **Hernandez-Martín E, Otero C.** Different enzyme requirements for the síntesis of biodiesel: Novozym-435 and Lipozyme TL IM. *Biores. Tech.*, 99 (2008) 277-286.
- [157] **Oda M, Kaieda M, Hama S, Yamaji H, Kondo A, Izumoto E, Fukuda H.** Facilitatory effect of immobilized lipase-producing *Rhizopus oryzae* cells on acyl migration in biodiesel-fuel production. *Biochem. Eng. J.*, 23 (2005) 45-51.
- [158] **Camacho F, Robles A, Gonzalez PA, Camacho B, Esteban L, Molina E.** Mechanistic model for the lipase-catalyzed alcoholysis of triacylglycerols. *Appl. Cat. A Gen.*, 301 (2006) 158-168.
- [159] **Vicente G, Martinez M, Aracil J.** Optimisation of integrated biodiesel production. Part I. A study of the biodiesel purity and yield. *Biores. Tech.*, 98 (2007) 1724-1733.
- [160] **Lang X, Dalai AK, Bakhshi NN, Reaney MJ, Hertz PB.** Preparation and characterization of bio-diesels from various bio-oils. *Biores. Techn.*, 80 (2001) 53-62.
- [161] **Peterson C, Reece D.** Emissions characteristics of ethyl and methyl ester of rapeseed oil compared with low sulphur diesel control fuel in a chassis dynamometer test of a pickup truck. *Trans ASAE*, 39 (1996) 805-816.
- [162] **Behr A, Eilting J, Leschinski J, Lindner F.** Improved utilisation of renewable resources: new important derivatives of glycerol. *Green Chem.*, 10 (2008) 13-30.

- [163] **Corma A, Huber GW, Sauvanaud L, O'Connor P.** Processing biomass-derived oxygenates in the oil refinery: catalytic cracking (FCC) reaction pathways and role of catalyst. *J. Cat.*, 247 (2007) 307-327.
- [164] **Dodds DR, Gross RA.** Chemicals from biomass. *Science*, 318 (2007) 1250-1251.
- [165] **Pagliaro M, Ciriminna R, Kimura H, Rossi M, Della-Pina C.** From glycerol to value-added products. *Angew Chem., Int. Ed.* 46 (2007) 4434-4440.
- [166] **Hu J, Du Z, Li C, Min E.** Study on the lubrication properties of biodiesel as fuel lubricity enhancers. *Fuel*, 84 (2005) 1601-1606.
- [167] **Knothe G, Steidley KR.** Lubricity of components of biodiesel and petrodiesel. The origin of biodiesel lubricity. *Energy Fuels*, 19 (2005) 1192-1200.
- [168] **Knothe G, Steidley KR.** Kinematic viscosity of biodiesel fuel components. Influence of compound structure and comparison to petrodiesel fuel components. *Fuel*, 84 (2005) 1059-1065.
- [169] **Knothe G.** Biodiesel and the issue of diesel fuel lubricity. *Lipid Tech.*, 18 (2006) 105-108.
- [170] **Knothe G, Steidley KR.** Kinematic viscosity of biodiesel components (fatty acid alkyl esters) and related compounds at low temperatures. *Fuel*, 86 (2007) 2560-2567.
- [171] **Al-Zuhair S.** Production of biodiesel: possibilities and challenges. A review. *Biofuels Bioprod. Bioref.*, 1 (2007) 57-66.
- [172] **Melero J.A, Iglesias J, Morales J.** Heterogeneous acid catalysts for biodiesel production: current status and future challenges. *Green Chem.*, 11 (2009) 1285-1308.
- [173] **Dodds D.R, Gross R.A.** Chemicals from biomass. *Science*, 318 (2007) 1250-1251.
- [174] **Yazdani S.S, Gonzalez R.** Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. *Curr. Opin. Biotech.*, 18 (2007) 213-219.

- [175] **Camacho F, Robles A, Gonzalez P.A, Camacho B, Esteban L, Molina E.** Mechanistic model for the lipase-catalyzed alcoholysis of triacylglycerols. *Appl. Cat. A.*, 301 (2006) 158-168.
- [176] **Wei Li, Wei Du, Qiang Li, Ren-wang Li, Dehua Liu.** Dependence on the properties of organic solvent: Study on acyl migration kinetics of partial glycerides. *Biores. Tech.*, 101 (2010) 5737-5742.
- [177] **Li W, Du W, Li Q, Sun T, Liu D.** Study on acyl migration kinetics of partial glycerides: Dependence on temperature and water activity. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic*, 63 (2010) 17-22.
- [178] **Yuanyuan Xu, Wei Du, Dehua Liu, Jing Zeng.** A novel enzymatic route for biodiesel production from renewable oils in a solvent-free medium. *Biotechnology Letters*, 25 (2003) 1239-1241.
- [179] **Nadir Dizge, Bülent Keskinler.** Enzymatic production of biodiesel from canola oil using immobilized lipase. *Biom. Bioenergy*, 32 (2008) 1274-1278.
- [180] **Nadir Dizge, Coskun Aydinler, Derya Y. Imer, Mahmut Bayramoglu, Aziz Tanriseven, Bülent Keskinler.** Biodiesel production from sunflower, soybean, and waste cooking oils by transesterification using lipase immobilized onto a novel microporous polymer. *Biores. Tech.*, 100 (2009) 1983-1991.
- [181] **Hernández-Martín E, Otero C.** Different enzyme requirements for the synthesis of biodiesel: Novozym 435 and Lipozyme TL IM. *Biores. Tech.*, 99 (2008) 277-286.
- [182] **Wei Du, Yuan-Yuan Xu, De-Hua Liu, Ze-Bo Li.** Study on acyl migration in immobilized lipozyme TL-catalyzed transesterification of soybean oil for biodiesel production. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic*, 37 (2005) 68-71.
- [183] **Xin Chen, Wei Du, Dehua Liu.** Response surface optimization of biocatalytic biodiesel production with acid oil. *Biochem. Eng. J.*, 40 (2008) 423-429.

- [184] **Shashikant Vilas Ghadge, Hifjur Raheman.** Process optimization for biodiesel production from mahua (*Madhuca indica*) oil using response surface methodology. *Biores. Tech.*, 97 (2006) 379-384.
- [185] **Wei Li, Wei Du, Dehua Liu.** Optimization of whole cell-catalyzed methanolysis of soybean oil for biodiesel production using response surface methodology. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic*, 45 (2007) 122-127.
- [186] **Waldinger C, Schneider M.** Enzymatic esterification of glycerol III. Lipase-catalyzed synthesis of regioisomerically pure 1,3-sn-diacylglycerols and 1(3)-rac-monoacylglycerols derived from unsaturated fatty acids. *JAOCS.* (1996) Vol. 7. n° 11.

9.

APPENDIX

APPENDIX A: CONFERENCE COMMUNICATIONS

- ✓ PREPARATION OF BIODIESEL-LIKE BIOFUELS USING RESPONSE SURFACE METHODOLOGY AND A LOW COST LIPASE DERIVED FROM *THERMOMYCES LANUGINOSUS*. 6th International Conference on Renewable Resources & Biorefineries. Düsseldorf, Germany, 7th – 9th June 2010.
- ✓ NEW BIOFUEL THAT INTEGRATE GLYCERINE AS MONOGLYCERIDE BY USING *RHIZOPUS ORYZAE* DERIVED LIPASE AND RESPONSE SURFACE METHODOLOGY. COST Action CM0903 (UBIOCHEM), 1st Workshop, Córdoba, Spain, 13-15th May 2010.
- ✓ LOW COST LIPASE DERIVED FROM *THERMOMYCES LANUGINOSUS* AND A RESPONSE SURFACE METHODOLOGY FOR PRODUCTION OF A NEW KIND OF BIODIESEL. COST Action CM0903 (UBIOCHEM), 1st Workshop, Córdoba, Spain, 13-15th May 2010.
- ✓ ORGANIC-INORGANIC SOLID HYBRID AS SUPPORT FOR PIG PANCREATIC LIPASE IN BIODIESEL PRODUCTION. II Encuentro sobre Nanociencia y Nanotecnología de investigadores y tecnólogos de la Universidad de Córdoba, 14th January 2010.
- ✓ A NEW BIOFUEL PRODUCTION BY USING RESPONSE SURFACE METHODOLOGY AND *RHIZOPUS ORYZAE* DERIVED LIPASE. II Encuentro sobre Nanociencia y Nanotecnología de investigadores y tecnólogos de la Universidad de Córdoba, 14th January 2010.
- ✓ OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE OBTENCIÓN DE BIODIESEL MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE LA LIPASA PANCREÁTICA DE CERDO 1,3-REGIOSELECTIVA. Spanish Catalysis Society (SECAT'09), Ciudad Real, Spain, 29/June/2009 – 1/July/2009. (ISBN: 978-84-692-3159-3)
- ✓ OPTIMIZING THE PRODUCTION PROCESS ENZYMATIC BIODIESEL THROUGH THE USE OF PORK PANCREATIC LIPASE (PPL). 8th European Congress on Catalysis (EUROPACAT-IX), Salamanca, Spain, 30/August/2009 - 4/September/2009.
- ✓ OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE BIODIESEL MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE LIPASAS DE BAJO COSTE. I Congreso Científico de Investigadores en Formación. Córdoba, Spain, 15-16th October 2009.
- ✓ OPTIMIZING THE PRODUCTION PROCESS ENZYMATIC BIODIESEL THROUGH THE USE OF PORK PANCREATIC LIPASE (PPL). BioMicroWorld 2009, Lisbon, Portugal, 2-4th December 2009.
- ✓ A NEW LIPASE-CATALYZED BIODIESEL BY RESPONSE SURFACE METHODOLOGY USING *RHIZOPUS ORYZAE* DERIVED LIPASE. BioMicroWorld 2009, Lisbon, Portugal, 2-4th December 2009.

- ✓ PRODUCTION OF A NEW BIODIESEL BY USING A LOW COST LIPASE DERIVED FROM *THERMOMYCES LANUGINOSUS* AND RESPONSE SURFACE METHODOLOGY. BioMicroWorld 2009, Lisbon, Portugal, 2-4th December 2009.
- ✓ NEW PROTEINS EXPRESSION BY PGPR *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* UNDER ARSENIC-INDUCED STRESS CONDITIONS. BioMicroWorld 2009, Lisbon, Portugal, 2-4th December 2009.
- ✓ A METHOD FOR DETECTION OF *RHIZOMUCOR MIEHEI* LIPASE ACTIVITY. BioMicroWorld 2009, Lisbon, Portugal, 2-4th December 2009.

APPENDIX B: SCIENTIFIC PUBLICATIONS



Production of a new second generation biodiesel with a low cost lipase derived from *Thermomyces lanuginosus*: Optimization by response surface methodology

Cristóbal Verdugo^a, Diego Luna^{a,*}, Alejandro Posadillo^b, Enrique D. Sancho^c, Salvador Rodríguez^c, Felipa Bautista^a, Rafael Luque^a, José M. Marinas^a, Antonio A. Romero^a

^a Departamento de Química Orgánica, Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales, Edificio Marie Curie, E-14014 Córdoba, Spain

^b Seneca Green Catalyst, S.L., Campus de Rabanales, E-14014 Córdoba, Spain

^c Departamento de Microbiología, Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales, Edificio Severo Ochoa, E-14014 Córdoba, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 June 2010

Received in revised form

26 November 2010

Accepted 3 December 2010

Available online 11 January 2011

Keywords:

Biodiesel

Ethanolysis

Lipase

Thermomyces lanuginosus

Sunflower oil transesterification

Lipopan BG

ABSTRACT

Biodiesel production has received considerable attention in the recent years as biodegradable and non-polluting fuel. In this work, an inexpensive purified 1,3-specific lipase from *Thermomyces lanuginosus* (Lipopan 50 BG from Novozymes AS, Denmark) was utilised as biocatalyst in an alternative approach to obtain a novel second generation biodiesel-like biofuel. This novel product, which integrates glycerol as monoacylglycerols (MG) into the biofuels composition, can avoid the removal step/s of such byproduct, mandatory in the production of conventional biodiesel. A multi-factorial design and response surface methodology (RSM) were employed to evaluate the effects of several conditions (temperature, molar ratio of ethanol to oil and pH) on the conversion of sunflower oil into a blend of Fatty Acid Ethyl Esters (FAEE), MG and diacylglycerols (DG). The effects of water content and concentration of lipase on conversion into FAEE and MG were also studied. Results obtained indicate that pH, molar ratio of ethanol to oil and water content were significant factors influencing the conversion in the systems under the investigated conditions. Low temperatures (20 °C), high pH values (close to 12), and an oil/ethanol volume ratios of 3.4/1 were found to be the key controlling parameters which provide optimised results after 1 h reaction (conversions around 70%; kinematic viscosities about 8.5 mm² s⁻¹).

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The production of biodiesel has become very important in recent years as potential alternative to partially fulfill the expected future energy demands in the transport sector [1,2]. Several methods have been reported for the production of biodiesel from vegetable or waste cooking oils and animal fats, including direct use and blending, microemulsification, pyrolysis, and transesterification [3].

Transesterification is currently one of the most attractive and widely accepted methodologies for biodiesel production [4]. The conventional method for biodiesel production involves the use of homogeneous base catalysts under mild heating (50–60 °C), although there are many others extended methodologies. Main factors affecting transesterification processes include reaction temperature, alcohol/oil molar ratio, type and concentration of catalyst as well as purity of reactants. In any case, an excess of alcohol is

normally utilised in the biodiesel production process in order to switch the equilibrium to the production of esters (with glycerol as main by-product) through a stepwise process. In spite of the alkaline impurities generated in the conventional method that need to be removed, glycerol is the main drawback of this method, not only because its generation reduces the atomic yield of the process, but also due to the extensive water cleaning of the biodiesel obtained in order to remove such residual glycerol and alkaline impurities.

We have recently developed a protocol for the preparation of novel types of biodiesel-like biofuels that integrate glycerol into their composition via 1,3-regiospecific enzymatic transesterification of sunflower oil using pig pancreatic lipase (PPL) [5,6]. This protocol predates any conventional method of biodiesel preparation, offering operating conditions remarkably simpler and more efficient and a process virtually waste-free of impurities (acidic or alkaline). No byproduct needs to be removed from the final reaction mixture, simplifying the procedure and reducing the environmental impact of the process [7–10]. These second generation biofuels also exhibit similar physical properties to those of conventional biodiesel and avoid the production of glycerol as by-product. Furthermore, monoacylglycerides (MG) were proved to enhance biodiesel lubricity as demonstrated by recent studies [11–14].

* Corresponding author at: Departamento de Química Orgánica, Universidad de Córdoba, Campus Universitario de Rabanales, Edificio Marie Curie (C-3), Carretera Nacional IV-A, Km 396, E-14014 Córdoba, Spain. Tel.: +34 957212065; fax: +34 957212066.

E-mail address: qo1lumad@uco.es (D. Luna).

This family of novel biofuels integrating glycerol into their composition were initially prepared taking advantage of the 1,3 selective nature of the pig pancreatic lipase (PPL) [5,6]. However, many other isolated lipases have this inherent 1,3 selective character and their application for biofuels production holds an interesting potential from an economical point of view due to their relative low cost. This is the case of the microbial lipase Lipopan 50 BG (Novozymes AS, Denmark), a purified lipase from *Thermomyces lanuginosus* microorganism, widely employed as bread emulsifier [15,16] but never been reported, to the best of our knowledge, as biocatalyst in any chemical process. Many reports have been published using lipases from this microorganism in order to obtain conventional biodiesel, both with free enzymes [17–19] and immobilized on several supports [20–28]. In some cases, central composite design and response surface methodology (RSM) were utilised to optimize the synthesis parameters in biodiesel production [18,19]. Results obtained in most cases pointed out the methanolysis of triglycerides (TG) did not work well as compared to other short chain alcohols such as ethanol [17–28].

In addition to this, a series of other parameters were found to need further investigations to have a better insight into the process for the production of this promising family of novel biofuels via biocatalysis. Water activity (a_w) has been recognised as a key parameter which determines the enzymatic activity [29]. Certain physical properties of enzymes have been shown to change depending on the hydration state of the proteins, influencing the measured reaction rates. Reaction media with $a_w < 0.5$ has been reported to provide optimum conversions to methyl esters in the immobilized lipase-catalysed production of biodiesel from restaurant grease using *Thermomyces lanuginosus* and *Candida antarctica* lipases [30].

Herein, we report an optimisation study of the most important parameters operating in the ethanolysis of sunflower oil using Lipopan 50 BG (Novozymes AS, Denmark), a purified lipase from *T. lanuginosus* microorganism, to obtain novel biofuels integrating glycerol into their composition. These parameters include water content, pH, oil/ethanol ratio and the effect of the temperature and quantity of biocatalyst on the efficiency of the solvent-free enzymatic process. In order to evaluate the influence of several parameters at the same time in the transesterification reaction, a multi-factorial design of experiments and response surface methodology has been developed.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Commercial sunflower oil was obtained locally. Chromatographically pure ethyl esters of palmitic acid, stearic acid, oleic acid, linoleic acid and linolenic acid were purchased from Accustandard, and methyl heptadecanoate was purchased from Sigma–Aldrich and used as such. Other chemicals including absolute ethanol and sodium hydroxide were commercially obtained from Panreac (>99% purity).

2.2. Analytical method

Reaction products were monitored by capillary column gas chromatography, using a Hewlett–Packard 5890 series II equipped with a flame ionization detector (FID) and an HT5 capillary column (25 m × 0.32 mm × 0.10 μm). The injection system was split–splitless. Helium was used as carrier gas was at a flow rate of 1.5 mL/min. The temperature program was an initial temperature of 70 °C, which was maintained for 2 min, and then increased

to 200 °C (7 °C/min) and subsequently to 400 °C (20 °C/min), where it was maintained over 5 min.

2.3. Alcoholysis reactions

Sunflower oil for food use, ethanol (Panreac, 99%) and a commercial low cost lipase, Lipopan BG (Novozymes AS, Denmark), were employed in the enzymatic ethanolysis reactions. These reactions were performed according to a previously reported methodology [5,6]. The mixture was stirred at controlled temperature (20–60 °C) in a 50 mL round bottom flask, at varying the pH values (in the 9–12 range) and reaction times of 1 h. This reactor was provided with temperature and stirred speed controllers and equipped with a reflux condenser to avoid ethanol losses. The speed was set at 500 rpm to avoid mass transfer limitations.

pH values were achieved by adding different volumes of aqueous solution of NaOH. In this regard, a blank reaction in the presence of the highest quantity of solution of NaOH was performed to rule out a potential contribution from the homogeneous NaOH catalysed reaction. Less than 10% conversion of the starting material was obtained, so that a homogenous contribution can be considered as negligible under the investigated conditions. The reaction mixture comprises of 9.4 g (12 mL, 0.01 mol) sunflower oil, a variable oil/alcohol volume ratio and different quantities of lipase. The influence of water activity (a_w) was also evaluated by the addition of different quantities of water to the reaction medium. All variable were studied and optimized according to a factorial experimental design and a response surface methodology.

2.4. Viscosity measurements

Viscosity becomes a critical parameter to change in the physical properties of vegetable oils due to its importance in the adequate operation of diesel engines. The transesterification process of oils and fats is currently developed in order to implement the resulting product with reduced viscosity as biofuel in existing diesel engines. Accurate viscosity measurements are critical to assess the quality of biofuels produced, since inappropriate viscosity values can decisively affect the optimum functioning of diesel engines.

Viscosities were determined in a capillary viscometer Oswald Proton Cannon–Fenske Routine Viscometer 33200, size 150. This is based on determining the time needed for a given volume of fluid passing between two points marked on the instrument. It correlates to the movement restriction suffered by the flow of liquid, as a result of internal friction of its molecules, depending on their viscosity. From the flow time (t , seconds), the kinematic viscosity (ν , centistokes, cSt) can be obtained from the equation: $\nu \times t = C$, where C is the constant calibration of the measuring system in $\text{cSt} \times \text{s}$, which is given by the manufacturer ($0.040350 \text{ mm}^2 \text{ s}^{-1}$, at 40 °C) and t the flow time in seconds. The kinematic viscosity is given by the ratio between the dynamic viscosity (h , in Poise, g/cm s) and the density (r , in g/cm^3) $\nu = h/r$, in cm^2/s or centistokes, cSt, mm^2/s .

2.5. Experimental design

The effect of process parameters in the enzymatic transesterification reaction and the optimum conditions for the conversion were studied using a multifactorial design of experiments with three factors run by the software StatGraphics® version 5.1. Two of them at three levels and the last one at two levels, giving us 36 runs (Table 1). The experiments were performed in random order. The experimental parameters selected for this study were reaction temperature, oil/ethanol ratio and pH. Table 1 shows the coded and actual values of the process parameters used in the design matrix shown in Table 2. The quantity of lipase in all these experiments

Table 1
Process parameters in factorial design: coded and actual values.

Variables	Unit	Level		
		–1	0	1
Temperature	°C	20	40	60
Oil/ethanol ratio (v/v)	mL/mL	6/1	–	3.4/1
pH	–	8	10	12

was fixed to 30 mg. All experiments were duplicated in order to avoid experimental errors.

2.6. Water content evaluation

A methodology was developed to evaluate the effect of water content in the reaction comprising on a series of experiments in which different and increasing amounts of water were added to the reaction media. All others parameters were fixed at optimum values obtained from previous response surface methodologies (RSM) for temperature (20 °C), pH (constant volume of NaOH solution, pH 12), oil to ethanol volumetric ratio 3.4/1 and 30 mg lipase.

Table 2
Experiments matrix of factorial design and the response obtained for conversion and viscosity. Model validation experiments are also shown.

Parameters				Conversion (%)		Kinematic viscosity (mm ² s ⁻¹)	
Run	Temperature	pH	Oil/ethanol ratio	Predicted	Observed	Predicted	Observed
1	1	0	–1	28.9		19.5	
2	1	–1	–1	43.7		10.3	
3	0	–1	–1	30.7		14.6	
4	–1	0	–1	37.5		14.5	
5	–1	1	1	67.1		8.9	
6	1	1	1	54.3		9.8	
7	–1	–1	–1	39.1		14.6	
8	0	1	–1	48.8		14.6	
9	0	0	1	53.6		9.8	
10	0	0	–1	42.8		14.2	
11	0	1	1	66.7		9.1	
12	1	1	–1	47		14.7	
13	1	–1	1	45		9.9	
14	1	0	1	49.1		10.6	
15	–1	0	1	46.6		10	
16	–1	–1	1	48.9		9.2	
17	0	–1	1	37.8		10.1	
18	–1	1	–1	51.8		16.5	
Repeated experiments							
19	0	0	–1	42.9		14.1	
20	–1	1	1	68.4		8.7	
21	–1	–1	–1	38.7		16.2	
22	–1	0	1	45.1		10.5	
23	1	–1	1	46.2		9.6	
24	0	–1	1	36.2		10.2	
25	–1	–1	1	50.1		9.1	
26	0	0	1	54.1		9.3	
27	1	1	1	55.1		9.4	
28	0	–1	–1	28.9		14.7	
29	1	1	–1	45.8		14.8	
30	–1	0	–1	38.2		14.5	
31	1	0	–1	29.2		20.2	
32	1	0	1	48.4		10.9	
33	0	1	–1	47.4		14.9	
34	0	1	1	65.4		9.3	
35	1	–1	–1	41.9		10.9	
36	–1	1	–1	52.3		14.8	
Parameters							
Parameters				Conversion (%)		Kinematic viscosity (mm ² s ⁻¹)	
Run	Temperature	pH	Oil/ethanol ratio	Predicted	Observed	Predicted	Observed
Validation experiments							
37	–0.8	0.3	0.6	51.6	47.4	11.2	10.6
38	0.1	–0.7	–0.2	39.5	34.6	12.6	14.2
39	–0.6	–0.2	–0.4	40.5	31.3	14.0	16.8

2.7. Effect of the quantity of lipase in the reaction

The effect of the amount of lipase in the reaction media is very important to select the correct reaction conditions. This parameter was evaluated in order to choose the necessary amount of lipase that maximizes conversion without mass transfer limitations. Previous optimized values obtained from RSM (pH 12, oil to ethanol ratio 3.4/1, 15 μL of water added, 20 °C, 1 h reaction) were chosen.

2.8. Statistical analysis

The experimental data obtained from experimental design were analyzed by RSM [34]. A mathematical model, following a second-order polynomial equation, was developed to describe the relationships between the predicted response variable (conversion) and the independent variables of reaction conditions, as it is shown in the Eq. (1), where y_{conv} is the predicted response variable; β_0 , β_i , β_{ii} , β_{ij} the intercept, linear, quadratic and interaction constant coefficients of the model, respectively; X_i , X_j ($i = 1, 3$; $j = 1, 3$; $i \neq j$) represent the coded independent variables

Table 3
Analysis of variance (ANOVA) for conversion.

Analysis of variance (ANOVA) for conversion				F-value	P-value
Source	Sum of squares	df	Mean square		
(A) Temperature	100.86	1	100.86	3.92	0.0585
(B) pH	1393.85	1	1393.85	54.13	0
(C) Oil/ethanol ratio	1139.06	1	1139.06	44.24	0
AA	0.845	1	0.845	0.03	0.8577
AB	87.4225	1	87.4225	3.4	0.0768
AC	2.04167	1	2.04167	0.08	0.7805
BB	215.281	1	215.281	8.36	0.0076
BC	75.9704	1	75.9704	2.95	0.0977
Bloqs	0.7225	1	0.7225	0.03	0.8683
Total error	669.471	26	25.7489		
Total (corr.)	3685.53	35			

$R^2 = 0.898$; R^2 (Adj.) = 0.825.

(reaction conditions):

$$y_{\text{conv}} = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i < j=1}^3 \sum_{j=1}^3 \beta_{ij} X_i X_j \quad (1)$$

Response surface plots were developed using the fitted quadratic polynomial equation obtained from regression analysis, holding one of the independent variables at constant values corresponding to the stationary point and changing the order two variables. The quality of the fit of the polynomial model equation was evaluated by the coefficient of determination R^2 , and its regression coefficient significance was checked with F -test. Confirmatory experiments were carried out in order to validate the model, using combinations of independent variables which were not part of the original experimental design, but within the experimental region.

3. Results and discussion

3.1. Analysis of variance (ANOVA)

The analysis of variance methods has become very attractive in reaction parameters optimization and in the evaluation of the effects of the parameters in the TG transesterification reaction [31–33] due to its effectiveness in the analysis of variables. The results of factorial design suggested that the major factors affecting the transesterification, for the production of biofuels integrating glycerol as monoacylglycerol, were pH and oil/ethanol ratio (v/v) as shown in Table 3. To improve catalytic efficiency, a three and two level-three-factor multifactorial analysis (ANOVA) was adopted to evaluate the effects of the aforementioned factors on conversion and kinematic viscosity. Results have been summarised in Table 2.

Data was fitted to quadratic polynomial model using the software Statgraphics version 5.1. The quadratic polynomial model was highly significant and sufficient to explain the relationship between conversion/kinematic viscosity and important variables, as summarised in Tables 3 and 4.

Determination coefficients R^2 were 0.898 for conversion and 0.753 for kinematic viscosity, respectively, which imply a good fit between models and experimental data (Figs. 1 and 2). The adjusted correlation coefficients R^2 were 0.825 and 0.738 for conversion and kinematic viscosity, respectively (Table 3). Obtained results pointed out that the pH and oil/ethanol (v/v) ratio were also important parameters influencing the conversion in the systems ($p < 0.05$). Interestingly, that was not the case of the temperature which was in the significance borderline ($p = 0.0585$). Only initial oil/ethanol ratio (and a quadratic level for pH) was significantly important factors ($p < 0.05$) influencing the kinematic viscosity of reaction products (Table 4).

Table 4
Analysis of variance (ANOVA) for kinematic viscosity.

Analysis of variance (ANOVA) for conversion				F-value	P-value
Source	Sum of squares	df	Mean square		
(C) Oil:ethanol ratio	246.752	1	246.752	92.58	0
BB	13.6503	1	13.6503	5.12	0.0306
Bloqs	0.0367361	1	0.0367361	0.01	0.9073
Total error	85.2931	32	2.66541		
Total (corr.)	345.732	35			

$R^2 = 0.753$; R^2 (Adj.) = 0.738.

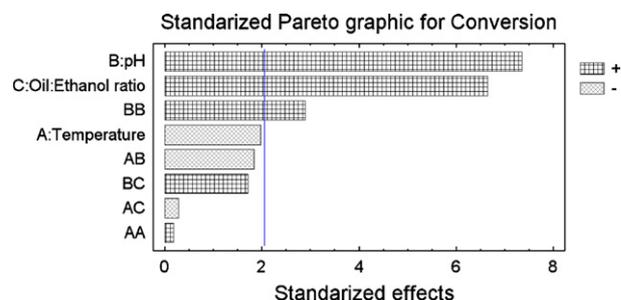


Fig. 1. Pareto graphic for conversion.

After the elimination of non influent parameters in the model for conversion and kinematic viscosity, the R^2 values for conversion and kinematic viscosity were 0.746 and 0.753 respectively, and the equations obtained were remarkably simpler as compared to initial ones.

$$\text{conversion} = 43.03 + 7.62 \times \text{pH} + 5.63 \times \text{ratio} + 5.19 \times \text{pH}^2 \quad (2)$$

$$Y_{\text{Kinem.Visc.}} (\%) = 13.18 - 2.62 \times \text{ratio} - 1.31 \times \text{pH}^2 \quad (3)$$

3.2. Optimization of the reaction parameters by RSM

The surface plots described by the regression model were drawn to display the effects of the independent variables on conversion (Fig. 3) and kinematic viscosity (Fig. 4). The influence of the different variables in the conversion of the systems can be clearly seen.

This model showed that the optimum values for the parameters to maximize conversion were low temperatures (20 °C), pH = 12 and oil/ethanol (v/v) ratio = 3.4/1. Conversions around 70% and values of kinematic viscosity about 8.5 mm² s⁻¹ could be achieved under these conditions, which in theory will render feasible the utilization of the obtained biofuel in blends with diesel. For example, the addition of 35% of petrodiesel with this biofuel reduces the viscosity to 4.8 mm² s⁻¹, falling within the acceptance limits of the EN 14214.

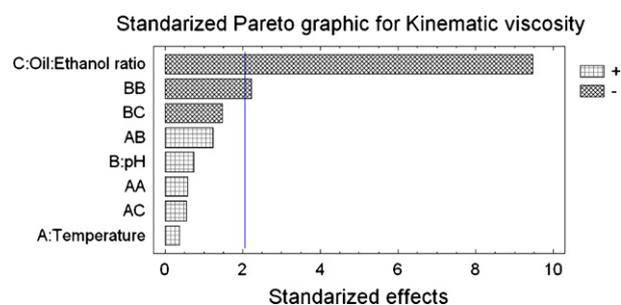


Fig. 2. Pareto graphic for the kinematic viscosity.

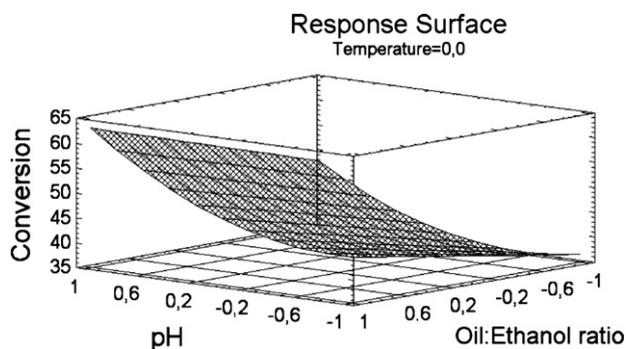


Fig. 3. Conversion vs pH and oil/ethanol ratio response surface plot (more influential parameters).

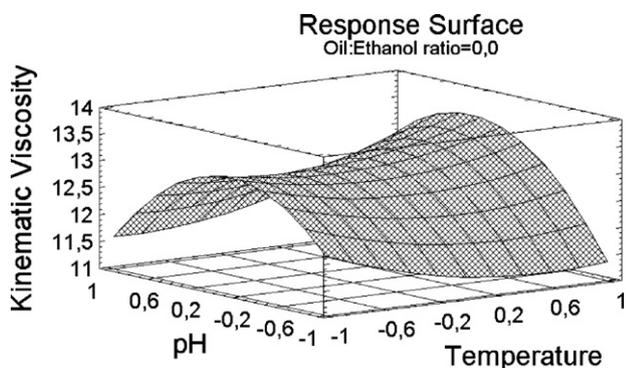


Fig. 4. Kinematic viscosity vs pH and oil/ethanol ratio response surface plot (more influential parameters).

3.3. Effect of water content

The water content is a highly important parameter in enzymatic transesterification, especially in solvent-free systems. A series of experiments under optimal conditions for T , pH and oil/ethanol ratio, obtained from previous RSM studies, were carried out to evaluate the effect of this parameter.

Fig. 5 shows the effect of water content in conversions obtained in the transesterification reaction. A minimum in kinematic viscosity, which corresponds to a maximum in conversion, was achieved at a concentration of 13.6% of added water. Consequently, the water content is a very important parameter that is necessary to control, in general, in ethanolysis process.

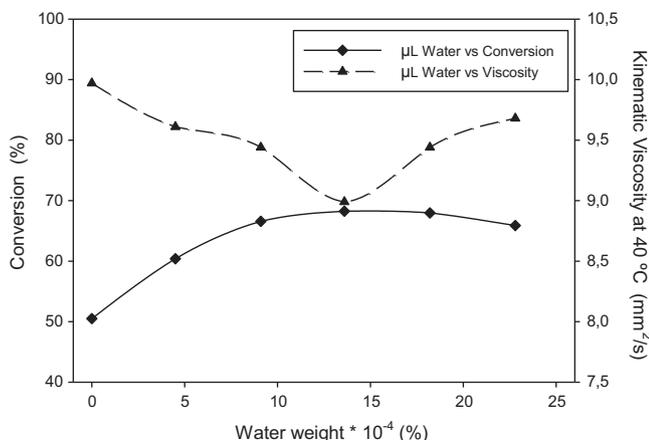


Fig. 5. Influence of water content on conversion and kinematic viscosities.

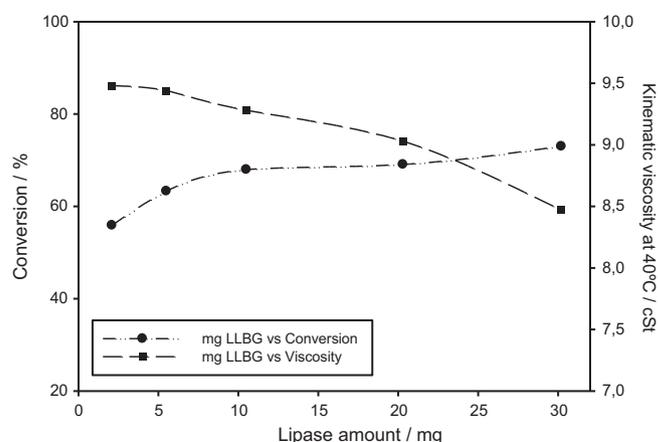


Fig. 6. Influence of the quantity of lipase on conversion and kinematic viscosities.

3.4. Effect of the quantity of lipase

Fig. 6 depicts the effect of the quantity of enzyme utilised on conversion and kinematic viscosity. 20 mg lipase was selected as optimum value in all reactions, as this quantity was shown to be sufficient to provide a combined good conversion and kinematic viscosity values. Improved viscosity values could be obtained using more quantities of biocatalyst but larger amounts of enzymes will have a detrimental effect on the economics of the process.

4. Conclusions

A purified lipase from *T. lanuginosus* microorganism, Lipopan 50 BG (Novozymes AS, Denmark), usually used as bread emulsifier, was successfully evaluated as inexpensive 1,3 selective biocatalyst in the ethanolysis of refined sunflower oil.

Reactions carried out under optimised conditions rendered a novel type of biodiesel-like biofuel comprising of a mixture of monoacylglycerols and FAEs (1/2 nominally), that can be potentially blend directly with petrodiesel. This new biofuel can be obtained at very short reaction times (50 min) and under mild reaction conditions.

The analysis of variance showed that, in order to obtain an improvement in conversion and kinematic viscosity of the transesterification of sunflower oil with ethanol in solvent free conditions, low temperatures (20 °C), high pH values (close to 12) and an oil/ethanol ratio of 3.4/1 should be the operating parameters. The quadratic models obtained also showed good results in terms of predicting the conversion and kinematic viscosity in the investigated systems.

The proposed methodology offers a comparatively higher atomic yield as compared to conventional biodiesel production (no glycerol byproduct generated), as well as a straightforward processing and end-use after its preparation, avoiding purification steps of residual glycerol.

Acknowledgements

Grants from Consejería de Educación y Ciencia de la Junta de Andalucía (FQM 0162 and FQM-02695), Instituto Andaluz de Biotecnología, Junta de Andalucía (BIOANDALUS 08/13/L35) FEDER funds and Ministerio de Ciencia e Innovación (Project CTQ2008-01330/BQU) are gratefully acknowledged. SUSTOIL (EU program, Topic ENERGY.2007.3.3.3) and Excellence Project of Junta de Andalucía (P09-FQM-4781) are also acknowledged. We are also gratefully to Novozymes AS, Denmark, for the kindly supply of the studied lipase.

References

- [1] A. Demirbas, *Energy Conv. Manage.* 50 (2009) 14–34.
- [2] R. Luque, L. Herrero-Davila, J.M. Campelo, J.H. Clark, J.M. Hidalgo, D. Luna, J.M. Marinas, A.A. Romero, *Energy Environ. Sci.* 1 (2008) 513–596.
- [3] A.C. Pinto, L.L.N. Guarieiro, M.J.C. Rezende, N.M. Ribeiro, E.A. Torres, W.A. Lopes, *J. Braz. Chem. Soc.* 16 (2005) 1313–1330.
- [4] J. Van Gerpen, *Fuel Process. Technol.* 86 (2005) 1007–1097.
- [5] V. Caballero, F.M. Bautista, J.M. Campelo, D. Luna, J.M. Marinas, A.A. Romero, J.M. Hidalgo, R. Luque, A. Macario, G. Giordano, *Process. Biochem.* 44 (2009) 334–342.
- [6] C. Verdugo, R. Luque, D. Luna, J.M. Hidalgo, A. Posadillo, E. Sancho, S. Rodríguez, S. Ferreira-Días, F.M. Bautista, A.A. Romero, *Bioresour. Technol.* 101 (2010) 6657–6662.
- [7] S. Al-Zuhair, *Biofuels Bioprod. Bioref.* 1 (2007) 57–66.
- [8] D. Royon, M. Daz, G. Ellenrieder, S. Locatelli, *Bioresour. Technol.* 98 (2007) 648–653.
- [9] A. Salis, M. Monduzzi, V. Solinas, Use of lipases for the production of biodiesel, in: J. Polaina, A.P. MacCabe (Eds.), *Industrial Enzymes. Structure, Function and Applications*, Springer, Netherlands, 2007.
- [10] S. Shah, M.N. Gupta, *Process. Biochem.* 42 (2007) 409–414.
- [11] J. Hu, Z. Du, C. Li, E. Min, *Fuel* 84 (2005) 1601–1606.
- [12] G. Knothe, K.R. Steidley, *Energy Fuels* 19 (2005) 1192–1200.
- [13] G. Knothe, *Lipid Technol.* 18 (2006) 105–108.
- [14] G. Knothe, K.R. Steidley, *Fuel* 86 (2007) 2560–2567.
- [15] S. Moayedallaie, M. Mirzaei, J. Paterson, *Food Chem.* 122 (2010) 495–499.
- [16] V. Stojceska, P. Ainsworth, *Food Chem.* 110 (2008) 865–872.
- [17] Y. Xu, W. Du, J. Zeng, D. Liu, *Biocatal. Biotransf.* 22 (2004) 45–48.
- [18] R.C. Rodrigues, G. Volpato, M.A.Z. Ayub, K. Wada, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 83 (2008) 849–854.
- [19] Y. Wang, H. Wu, M.H. Zong, *Bioresour. Technol.* 99 (2008) 7232–7237.
- [20] M.S. Souza, E.C.G. Aguiéiras, M.A.P. daSilva, M.A.P. Langone, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 154 (2009) 74–88.
- [21] N. Dizge, B. Keskinler, *Biomass Bioenergy* 32 (2008) 1274–1278.
- [22] N. Dizge, C. Aydiner, D.Y. Imer, M. Bayramoglu, A. Tanriseven, B. Keskinler, *Bioresour. Technol.* 100 (2009) 1983–1991.
- [23] E. Hernandez-Martín, C. Otero, *Bioresour. Technol.* 99 (2008) 277–286.
- [24] W. Du, Y. Xu, D. Liu, Z. Li, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 37 (2005) 68–71.
- [25] R. Costa-Rodrigues, G. Volpato, K. Wada, M.A.Z. Ayub, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 85 (2008) 925–930.
- [26] N. Dizge, B. Keskinler, A. Tanriseven, *Biochem. Eng. J.* 44 (2009) 220–225.
- [27] R.C. Rodrigues, J.M. Bolívar, A. Palau-Ors, G. Volpato, M.A.Z. Ayub, R. Fernandez-Lafuente, J.M. Guisan, *Enzyme Microbial Technol.* 44 (2009) 386–393.
- [28] O. Aybastier, C. Demir, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 63 (2010) 170–178.
- [29] A. Salis, M. Pinna, M. Monduzzi, V. Solinas, *J. Biotechnol.* 119 (2005) 291–299.
- [30] A. Hsu, K. Jones, T.A. Foglia, W. Marmer, *Biotechnol. Appl. Biochem.* 36 (2002) 181–186.
- [31] S.V. Ghadge, H. Raheman, *Bioresour. Technol.* 97 (2006) 379–384.
- [32] A. D’Cruz, M.G. Kulkarni, L.C. Meher, A.K.J. Dalai, *Am. Oil Chem. Soc.* 84 (2007) 937–943.
- [33] A.K. Tiwari, A. Kumar, H. Raheman, *Biomass Bioenergy* 31 (8) (2007) 569–575.
- [34] R.O. Kuehl, *Diseño de experimentos, Principios estadísticos para el diseño y análisis de investigación*, second ed., Thomson Learning, Mexico, 2001.



A comprehensive study of reaction parameters in the enzymatic production of novel biofuels integrating glycerol into their composition

Cristobal Verdugo^a, Rafael Luque^a, Diego Luna^{a,*}, Jose M. Hidalgo^b, Alejandro Posadillo^b, Enrique D. Sancho^c, Salvador Rodriguez^c, Suzana Ferreira-Dias^d, Felipa Bautista^a, Antonio A. Romero^a

^a Departamento de Química Orgánica, Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales, Edificio Marie Curie, 14014 Córdoba, Spain

^b Seneca Green Catalyst, S.L., Campus de Rabanales, 14014 Córdoba, Spain

^c Departamento de Microbiología, Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales, Edificio Marie Curie, 14014 Córdoba, Spain

^d Departamento de Agro-Indústrias e Agronomia Tropical, Instituto Superior de Agronomia, Tapada da Ajuda, 1349-017 Lisboa, Portugal

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 January 2010

Received in revised form 15 March 2010

Accepted 19 March 2010

Available online 8 April 2010

Keywords:

Biofuels

Ethanolysis

PPL

Sunflower oil transesterification

ABSTRACT

A comprehensive study of critical parameters in the pig pancreatic lipase (PPL) catalysed transesterification of sunflower oil to novel biofuels integrating glycerol into their composition is reported. The influence of oil/alcohol ratio, temperature, quantity of enzyme and water added and pH have been investigated. The enzymatic activity of PPL was found to be greatly influenced by the pH, reaching notable activities at high pH values (10–12), in contrast to other lipases. The addition of small quantities of NaOH (up to 0.1 mL) as coadjuvant in the transesterification reaction enhances the activity of the enzymes. This remarkable behaviour, reported for the first time, may pave the way for the utilisation of these relatively cheap enzymes in large scale commercial biodiesel production. Besides, a novel biofuels containing glycerol into their composition as mono- and diglycerides using PPL as biocatalyst has been developed.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Biofuels production has been encouraged over the past years as potential alternative to partially meet the expected future energy demands in the transport sector (Demirbas, 2009; Luque et al., 2008). One of the most widely spread biofuels, biodiesel, is increasingly being used in a wide range of countries worldwide as blends with conventional diesel. Biodiesel typically comprises of fatty acid (chains C₁₄–C₂₂) esters of short-chain alcohols, mainly methanol. Several methods have been reported for the production of biodiesel from vegetable or waste cooking oils and/or animal fats including direct use and blending, microemulsification, pyrolysis, and transesterification (Pinto et al., 2005).

Among these, transesterification is the most attractive and widely accepted methodology for biodiesel production (Van Gerpen, 2005). The conventional method for biodiesel production involves the use of homogeneous base catalysts (e.g., NaOH and KOH) under mild heating (50–60 °C). Other extended methodologies include the use of heterogeneous base catalysts (Verziu et al., 2008) or solid acids (Al-Zuhair, 2007; Melero et al., 2009)

as well as enzymatic protocols (Ranganathan et al., 2008). Main factors affecting transesterification processes include reaction temperature, alcohol/oil molar ratio, type of catalyst (and concentration) and purity of reactants. In any case, an excess of alcohol is normally utilised in the process to produce biodiesel in order to shift the equilibrium to the production of esters and glycerol as main by-product through a stepwise process.

Novel methodologies to prepare esters from lipids which directly afford alternative co-products are currently under development. The transesterification reaction of triglycerides with dimethyl carbonate (DMC), methyl acetate or ethyl acetate can generate a mixture of three molecules of FAME or FAEE and one of glycerol carbonate (GC) or glycerol triacetate (triacetin). Such mixtures (FAME + GC) have relevant physical properties to be employed as fuels, constituting a novel biofuel denoted as DMC-BioD (Caballero et al., 2009 and Luque et al., 2008). However, we have only found a study in which ethyl acetate was utilised as acyl acceptor by Modi et al. (2007) with Novozyme 435, where conversions above 90% for oils such as jatropha, karanj and sunflower oil were reported.

We have recently developed a protocol for the preparation of novel biofuels integrating glycerol into their composition via 1,3-regiospecific enzymatic transesterification of sunflower oil using an immobilised lipase (pig pancreatic lipase, PPL) (Caballero et al., 2009). We found that operating conditions compared to the conventional method of biodiesel preparation were much

* Corresponding author. Address: Departamento de Química Orgánica, Universidad de Córdoba, Campus Universitario de Rabanales, Edificio Marie Curie (C-3), Carretera Nacional IV – A, Km 396, E-14014 Córdoba, Spain. Tel.: +34 957212065; fax: +34 957212066.

E-mail address: qo1lumad@uco.es (D. Luna).

smoother and no impurities (acidic or alkaline) needed to be removed from the final mixture, simplifying separation and reducing the environmental impact of the process (Al-Zuhair, 2007; Royon et al., 2007; Salis et al., 2007; Shah and Gupta, 2007).

Furthermore, such biofuel exhibited similar physical properties to those of conventional biodiesel and, at the same time, avoided the production of glycerol as by-product in conventional biodiesel production. Last, but not least, monoglycerides (MG) and diglycerides (DG) were proven to enhance lubricity of biodiesel as demonstrated by recent studies (Knothe, 2006; Knothe and Steidley, 2007). Despite all promising features of these novel biofuels integrating MG and DG, the aforementioned 1,3-regioselectivity makes difficult to obtain yields higher than 50–60% at short times of reaction (Desai et al., 2006; Hernandez-Martín and Otero, 2008; Li et al., 2007; Rathore and Madras, 2007).

Only few reports of yields between 75% and 95% can be found at relatively longer times of reaction (more than 24 h) (Camacho et al., 2006; Paula et al., 2007). Our reported results thus opened up new ways to deal with the production of alternative biofuels using an enzymatic approach.

In contrast to most studied lipases, the role played by the presence of minor amounts of NaOH water solutions in the activity improvement of the enzymatic process was noticeable in our reported methodology using PPL (Caballero et al., 2009). PPL is an extracellular lipase, which operates in the digestive tract of mammals, actually under the higher pH values. It sounds reasonable that this enzyme may operate under similar experimental conditions (high pH) to those reported in the present work. Furthermore, the ionic concentration created by the added NaOH solution could also help to stabilise the structure of the enzyme. Comparatively, most studied lipases are intracellular materials obtained from bacteria or fungi, so that optimum operation conditions employed in such cases are close to neutral pH conditions.

In any case, reported results were preliminary and clearly unoptimised, so that there are some parameters that needed further investigation to have a better insight into the process for the production of this promising family of novel biofuels via biocatalysis employing ethanol and other short-chain alcohols as reagents. Among these, water activity (a_w) has been recognised as key parameter which determines the enzymatic activity (Salis et al., 2005). Physical properties of enzymes have been shown to change depending on the hydration state of the proteins, influencing the measured reaction rates. However, the way this phenomenon affects enzyme kinetics in detail is not known. Reaction media with $a_w < 0.5$ has been reported to provide the highest conversions to methyl esters in the immobilised lipase-catalysed production of biodiesel from restaurant grease using *Thermomyces lanuginosa* and *Candida antarctica* lipases (Hsu et al., 2002).

Here in, we report a comprehensive optimisation study of important parameters in the production of biofuels integrating glycerol into their composition. These include the influence of the reaction medium in terms of water activity with respect to pH and oil/ethanol ratio and the effect of the temperature on the efficiency of the enzymatic process using free PPL under solventless conditions.

2. Methods

2.1. Alcoholysis reactions

A commercial crude PPL (Type II, L3126, Sigma–Aldrich), sunflower oil for food use and ethanol (Panreac, 99%) were employed in the enzymatic ethanolysis reactions. These reactions were performed according to the procedure previously described (Caballero et al., 2009), that is, in a 50 mL round bottom flask under continu-

ous stirring at controlled temperature (40–60 °C) varying the pH values in the approximately 10–13 range. The various pH values were achieved by adding always 0.1 mL of aqueous solutions of different NaOH molar concentration, ranging between 1 and 10 N. In this regard, a blank reaction in the presence of the highest quantity of solution of NaOH was performed to rule out a potential contribution from the homogeneous NaOH catalysed reaction. Less than 10% conversion of the starting material was found under these conditions, so that a homogenous contribution can be considered as negligible under the investigated conditions. The reaction mixture comprises of 9.4 g (12 mL, 0.01 mol) sunflower oil, a variable oil/alcohol volume ratio and different amounts of free PPL. The influence of water activity (a_w) was also evaluated by the addition of different quantities of water to the reaction medium.

2.2. Compositional analysis of reaction products by gas chromatography and NMR spectroscopy

Samples were periodically withdrawn at different times of reaction (5–60 min) and quantified using a gas chromatograph HP 5890 Series II Gas fitted with a capillary column HT5, 0.1 μ m (25 m \times 0.32 mm, SGE). Dodecane was employed as internal standard. Since peak overlapping (especially between mono- and diglycerides) was found by GC, NMR was employed to accurately determine the MG/DG ratios.

NMR spectroscopy (^1H and ^{13}C) allows a very precise estimation of the ratio of these glycerol derived compounds (Diehl and Randel, 2007; Prestes et al., 2007; Vlahov, 2006). Thus, it is possible to quantify mono- and diglyceride content by combination of both techniques (data of the relative quantities MG/DG from ^1NMR experiments, Fig. 2; and the total quantity MG + DG mix from GC results). NMR spectra were collected on a computerised NMR Bruker 400 MHz (NMR service of the Universidad de Córdoba). ^{13}C NMR experiments have been carried out following the methodology described by Vlahov (2006), while Mannina et al. reported protocol has been followed to run ^1H NMR experiments. Experimental parameters were optimised to obtain the best ratio S/N possible, so as to ensure the achievement of quantitative results.

^{13}C NMR allows the identification of the MG and DG in the area of 174 ppm, with low S/N values, while the simpler ^1H NMR spectra gives separately MG and DG signals between 4 and 4.5 ppm. In any case, both spectra show very similar results.

Of note is that NMR analysis of the whole series of optimisation experiments performed in this work showed no significant differences in the DG/MG ratio, all values in the range of DG/MG 0.13–0.15. Thus, the quantities of diglycerides in the blends MG + DG never exceed 15% of the mix. In general, DG amounts often account for 8–10% of the total MG + DG content, so that in most experiments MG are mostly obtained. Under optimised conditions (40–50 °C, oil/ethanol 2/1 ratio and 0.01 g of PPL, 1 h reaction) the maximum MG + DG content is around 20%, corresponding to about 3% DG and 17% MG.

Reported results are then expressed as relative quantities of the corresponding fatty acid ethyl esters (FAEE) and the sum of the quantities of MG and DG (MG + DG) that cannot be clearly discriminated with GC method. Yield (%) thus refers to the relative quantities of FAEE produced. Conversion values include the total amounts (%) of triglyceride transformed (FAEE + MG + DG). The reaction rates and turnover frequencies (TOF, $\text{mol h}^{-1} \text{g}^{-1}$ PPL) were calculated from the yield, considering the amount of FAEE generated per unit of reaction time and per unit weight of PPL enzyme employed.

2.3. Viscosity measurements

Viscosity is a critical parameter essential to change in vegetable oils in order to implement the resulting product with reduced viscosity as biofuel in existing diesel engines. Accurate viscosity measurements are critical to assess the quality of biofuel produced, since inappropriate viscosity values can decisively affect the correct functioning of the diesel engine.

Viscosities were determined in a capillary viscometer Oswald Proton Cannon–Fenske Routine Viscometer 33200, size 150. This is based on determining the time needed for a given volume of fluid passing between two points marked on the instrument. It correlates to the movement restriction suffered by the flow of liquid, as a result of internal friction of its molecules, depending on their viscosity. From the flow time, t , in seconds, the kinematic viscosity (ν , centistokes, cSt) can be obtained from the equation: $\nu \times t = C$, where C is the constant calibration of the measuring system in $\text{cSt} \times \text{s}$, which is given by the manufacturer ($0.10698 \text{ mm}^2 \text{ s}^{-1}$, at 40°C) and t the flow time in seconds. The kinematic viscosity also represents the ratio between the dynamic viscosity (η , in Poise, g/cm s) and the density (ρ , in g/cm^3) $\nu = \eta/\rho$, in cm^2/s or centistokes, cSt, mm^2/s .

3. Results and discussion

3.1. Effect of different parameters on the enzymatic activity

3.1.1. Influence of the oil/ethanol ratio on PPL activity

Different oil/ethanol (v/v) ratios (in a solvent-free media employing a one-step addition of the alcohol to the reaction system) were investigated in order to study the influence of the reaction operational conditions. Results are summarised in Table 1.

Conversion decreases in the systems at higher oil/ethanol ratios (from 1/2 to 1/8), as expected in biodiesel synthesis (Al-Zuhair, 2007; Melero et al., 2009), with a decrease in the PPL processing capacity expressed as TOF. This decrease in activity is also accompanied by the formation of increasing quantities of MG + DG (as well as unconverted TG) that leads to a significant increase of viscosity, almost linear, at higher oil/ethanol ratios.

Under optimised conditions (oil/ethanol 2/1, 50°C , 0.01 g PPL, 30 min reaction), a 83% conversion was obtained, with 17% of unconverted TG as well as 15% MG + DG (2% DG and 13% MG as determined by ^1H NMR studies). A very good viscosity (6.2 cSt) was obtained for this particular biofuel composition, which potentially could almost be employed directly without any blend with diesel fuel (Corma et al., 2007; Dodds and Gross, 2007; Yazdani and Gonzalez, 2007).

This behaviour could be mainly attributed to the increase in the diffusional efficiency associated to increasing quantities of ethanol rather than to the influence of this parameter on stoichiometry. The lipase mechanism is in this case not significantly affected by changes in oil/ethanol ratios as it happens when a catalysed chemistry process is developed.

3.1.2. Influence of reaction time on enzymatic activity of PPL

Results included in Table 2 indicate that quantitative conversion in the systems could be achieved in less than 1 h (typically

Table 2

Effect of the time of reaction on conversion, yields (mol% by GC) and TOF in the ethanolysis of sunflower oil using PPL as biocatalyst.^a

Time (h)	FAEE (mol %)	MG + DG (mol%)	TG (mol%)	Conv. (mol%)	TOF ($\text{mmol h}^{-1} \text{g}^{-1}$ PPL)
0.08	66	16	17	83	7968
0.16	70	16	14	86	4194
0.25	74	14	12	88	2944
0.33	70	14	16	85	2112
0.42	72	15	13	87	1735
0.50	72	14	14	86	1438
0.67	73	17	10	>90	1098
0.83	81	19	–	>99	968
1.00	74	26	–	>99	739

^a Reaction conditions: 12 mL (0.01 mol) sunflower oil, 6 mL ethanol, 0.01 g PPL, 50°C , pH 12 (reached through the addition of 0.1 mL NaOH 10 N solution).

45 min). Shorter reaction times were found to be not adequate to establish the kinetics of the enzyme activity due to the partially reversible character of the ethanolysis process.

Interestingly, the maximum possible quantities of FAEE (around 67%, theoretical maximum yield allowed by the 1,3 PPL regioselectivity) were observed at early times of reaction (3–5 min) (Caballero et al., 2009). The additional 6% conversion to FAEE can be attributed to the 1,2-acyl-migration from MG, favored by the slightly basic reaction conditions (Camacho et al., 2006).

3.1.3. Influence of the quantities of PPL on the enzymatic activity

Various ethanolysis reactions using increasing amounts of PPL, under identical experimental conditions, were performed to find out optimum conditions for biofuels production (Fig. 1). Increasing quantities of PPL (from 0.01 to 0.06 g) did not significantly influence the activity in the systems in the reaction, with similar conversions found in the reaction, so that a remarkable decrease in conversion per hour and unit of PPL weight (TOF) could be obtained at increasing biocatalyst quantities. This phenomenon might be due to the formation of enzyme agglomerates (often visible in the solution) that hinder the full contact of individual PPL macromolecules with reactants.

Consequently, 0.01 g PPL were selected as optimised quantity of biocatalyst as it implies lower enzyme consumption and costs, giving comparable results to those obtained using 0.04 and 0.06 g PPL.

3.1.4. Influence of the temperature on PPL activity

The influence of the reaction temperature on PPL activity was studied under two different oil/ethanol ratios (2/1 and 6/1). Results summarised in Table 3 for an oil/ethanol 2/1 ratio showed slowly decreased reaction rates (TOF) with temperature, with a maximum activity (71% FAEE, quantitative conversion) at 40°C , the lower investigated temperature. A similar kinetic behaviour of the enzymatic process was observed at higher oil/alcohol ratios (6/1).

Similarly, increasing quantities of DG and TG were also found in both cases at increasing temperatures (Table 3), therefore suggesting lower temperatures are more convenient to perform the enzymatic process for practical reasons. The effect of temperature has been investigated in depth in the 40 – 60°C range for the particular

Table 1

Viscosity, yield, conversion (mol% by GC) and TOF obtained in the ethanolysis of sunflower oil at different oil/ethanol ratios using PPL as catalyst.^a

Oil/ethanol ratio (mL/mL) (mol/mol)	Kinematics viscosity 40°C (cSt)	FAEE (mol%)	MG + DG (mol%)	TG (mol%)	Conv. (mol%)	TOF ($\text{mmol h}^{-1} \text{g}^{-1}$ PPL)	
(12/6) = 2/1	1/10.3	6.2	69	15	16	83	692
(12/3) = 4/1	1/5.1	11.8	52	31	17	62	518
(12/2) = 6/1	1/3.3	14.8	33	27	41	55	554
(12/1.5) = 8/1	1/2.6	18.8	26	21	53	56	259

^a Reaction conditions: 12 mL (0.01 mol) sunflower oil, 0.01 g PPL, 50°C , 1 h reaction, pH 12 (reached through the addition of 0.1 mL NaOH 10 N solution).

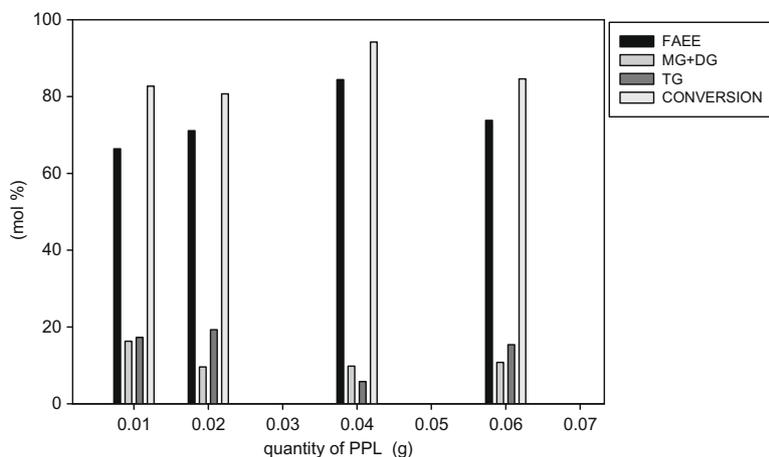


Fig. 1. Effect of the quantity of PPL on conversion (mol%) and reaction products composition (obtained by GC analysis) in the ethanolysis of sunflower oil. Reaction conditions: 12 mL sunflower oil (0.01 mol), 6 mL ethanol (oil/ethanol 2/1 ratio), 50 °C, 1 h reaction, pH 12 (reached through the addition of 0.1 mL NaOH 10 N solution).

Table 3
Effect of the temperature on conversion, yields (mol% by GC) and TOF in the ethanolysis of sunflower oil using PPL as catalyst.^a

Temperature (°C)	FAEE (mol%)	M + D (mol%)	TG (mol%)	Conv. (mol%)	TOF (mmol h ⁻¹ g ⁻¹ PPL)
40 ^b	71	29	0	>99	711
50 ^b	70	16	15	86	700
60 ^b	65	15	19	81	652
40 ^c	72	28	–	>99	719
50 ^c	62	25	13	87	623
60 ^c	55	26	19	81	552

^a Standard reaction conditions: 12 mL (0.01 mol) sunflower oil, 0.01 g of PPL, 1 h reaction, pH 12 (reached through the addition of 0.1 mL NaOH 10 N solution).

^b Oil/ethanol ratio 2/1 (12 mL oil/6 mL ethanol).

^c Oil/ethanol ratio 6/1 (12 mL oil/2 mL ethanol).

case of the optimised 2/1 oil/ethanol ratio (Fig. 2), according to the results in Table 1.

Biocatalysts also exhibited decreased TOF values at increasing reaction temperatures, apparently against the Arrhenius law. However, this behaviour is probably related to the partial denaturalisation of the enzyme at higher temperatures (55 °C and above).

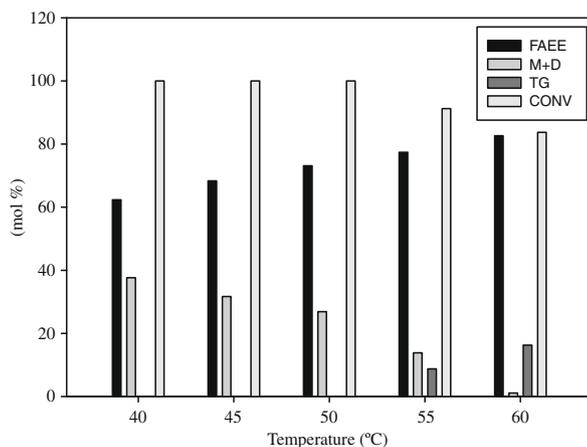


Fig. 2. Effect of the temperature of reaction on conversion (mol%) and reaction products distribution in the ethanolysis of sunflower oil catalysed by PPL. Reaction conditions: 12 mL (0.01 mol) sunflower oil, 6 mL ethanol (oil/ethanol 2/1 ratio), 0.01 g of PPL, 1 h reaction, pH 12 (reached through the addition of 0.1 mL NaOH 10 N solution).

According to these findings, we can conclude that there is no influence of the oil/alcohol molar ratio on the enzymatic alcoholysis reaction mechanism due to the similar evolution of TOF data with temperature (Table 3 and Fig. 2).

3.2. Effect of water activity and pH on the enzymatic activity

Since alcoholysis reactions do not involve water, its presence could promote the hydrolysis of the esters, thus decreasing product yields (Corma et al., 2007; Diehl and Randel, 2007; Dodds and Gross, 2007; Hsu et al., 2002; Prestes et al., 2007; Vicente et al., 2007; Vlahov, 2006; Yazdani and Gonzalez, 2007; Wehtje and Adlercreutz, 2000). The effect of water content [water activity, a_w , expressed as water concentration in the organic phase or total water content of the system] on enzymatic activity (conversion) and viscosity of the biofuels obtained was herein investigated adding small quantities of water to the reaction mixture under reported conditions (6/1 oil/ethanol ratio, 0.01 g PPL, 40 °C, pH 12, 60 min reaction). Conversions observed show a remarkable dependence of a_w , (Fig. 3) where the presence of 0.1 mL of water is sufficient to cause a notable drop in activity (from 90% to 35%).

These results are generally consistent with the usual behaviour of lipases that are sensitive to water activity conditions. Hydrophobic solvents normally allow higher lipases activities than those obtained with hydrophilic ones, indicating that hydrophilic solvents hinder enzyme activity, but do not remove any water from the enzyme. Highest water contents (superior to 0.8%) lead to significantly reduced reaction rates (Wehtje and Adlercreutz, 2000). However, extracellular lipases from *Rhizopus oryzae* (*R. oryzae*) have been reported to catalyse methanolysis reactions in the presence of 4–30% water content in the starting materials, while the enzymes were nearly inactive in the absence of water (Watanabe et al., 2000). *R. Oryzae* could be therefore considered a potentially effective enzyme to employ in the transesterification of waste oils and fats that generally contain certain water amounts (Ban et al., 2001).

A series of experiments were also developed (at constant water quantities) to study the influence of the pH in the activity of the enzyme under optimised conditions, varying the oil/ethanol ratio. Results are summarised in Fig. 4. Interestingly, the pH effects are close related to oil/ethanol ratios. High conversion values (close to 80%) can be obtained at significantly different oil/ethanol ratios by simply tuning the NaOH concentration (e.g., NaOH 10 and 7 N to give the maximum conversion for 2/1 and 6/1 oil/ethanol ratios,

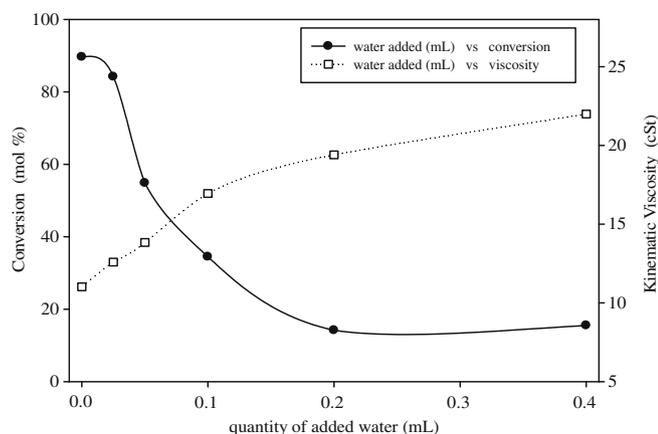


Fig. 3. Influence of water added on conversion (mol%) and viscosity (cSt) of the novel biofuel obtained via PPL catalysed ethanolysis of sunflower oil. Reaction conditions: 12 mL (0.01 mol) sunflower oil, 2 mL ethanol (oil/ethanol 6/1 ratio), 0.01 g PPL, 40 °C, 1 h reaction, pH 12 (reached through the addition of 0.1 mL NaOH 10 N solution).

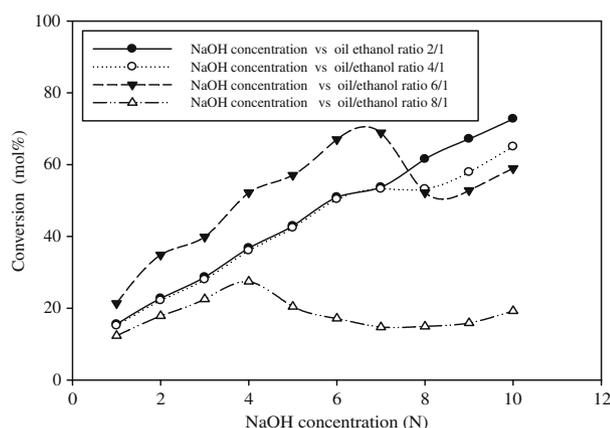


Fig. 4. Influence of NaOH (added as coadjutant) concentration on conversions (mol%) in the PPL catalysed ethanolysis sunflower oil. Reaction conditions: 12 mL (0.01 mol) sunflower oil, 0.01 g of PPL, 40 °C, 1 h reaction, carried out at constant quantities of added water and different oil/ethanol ratios: (●) oil/ethanol = 2/1, v/v; (○) oil/ethanol = 4/1, v/v; (▼) oil/ethanol = 6/1, v/v; (△) oil/ethanol = 8/1, v/v.

respectively). To the best of our knowledge, this is the first report accounting for this unusual effect in PPL catalysed processes.

It is worth pointing out at this stage that the alkaline solutions added (NaOH solution in the range 1–10 N, up to 0.1 mL) act as adjuvant in the ethanolysis process, but never as catalyst by themselves as reaction runs in the absence of the enzyme (even at the maximum concentration of NaOH solution added) gave conversions of the starting material inferior to 10% after 60 min reaction. This remarkable enzyme activity behaviour of the PPL can influence their actual application in commercial-scale biodiesel production, given the relatively low cost of PPL.

These results are consistent with those reported in the optimisation process of several lipases for biofuels production (Shieh et al., 2003) where the effects of reaction time, temperature, enzyme amount, molar ratio of alcohol to oil, and added water content on percentage weight conversion to fatty acid alcohol esters by lipase transesterification have to be precisely evaluated. However, the adequate presence of alkaline metals in the reaction medium is reported in this work, for the first time, as a pre-requisite to obtain maximised yields under optimum conditions in PPL cata-

lysed reactions. Indeed, very low conversions are normally obtained with PPL when operated in the absence of NaOH as adjuvant. However, PPL has been reported to increase the efficiency when operating under solventless CO₂ supercritical conditions (Kumar et al., 2004).

4. Conclusions

Optimisation of critical parameters in the preparation of novel biofuels containing glycerol into their composition as mono- and diglycerides using pig pancreatic lipase (PPL) as biocatalyst has been developed. The best conditions are volumetric ratio oil/alcohol in the range 2–6/1, 40 °C temperature, 0.9 h reaction, quantities lower than 0.01 g of biocatalyst, to produce the best results in terms of conversion and viscosity values. Quantitative conversions of triglycerides can be obtained under these optimised conditions, with a low contribution of MG + DG content (around 20% or less). The enhanced activity of PPL at obtained conditions, may pave the way for the utilisation of these enzymes in commercial biodiesel production.

Acknowledgements

Grants from Consejería de Educación y Ciencia de la Junta de Andalucía (FQM 0162, FQM 0191 and FQM-02695), Instituto Andaluz de Biotecnología, Junta de Andalucía (BIOANDALUS 08/13/L35) FEDER funds and Ministerio de Ciencia e Innovación (Projects CTQ2008-01330/BQU and CTQ 2007-65754-PPQ) are gratefully acknowledged. SUSTOIL (EU program, Topic ENERGY.2007.3.3.3) and CYTED program 2007 (P707AC0586) are also acknowledged. R.L. also gratefully acknowledges Ministerio de Ciencia e Innovación for the provision of a Ramon y Cajal contract (RYC-2009-04199).

References

- Al-Zuhair, S., 2007. Production of biodiesel: possibilities and challenges. A review. *Biofuels Bioprod. Bioref.* 1, 57–66.
- Ban, K., Kaieda, M., Matsumoto, T., Kondo, A., Fukuda, H., 2001. Whole cell biocatalyst for biodiesel fuel production utilizing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles. *Biochem. Eng. J.* 8, 39–43.
- Caballero, V., Bautista, F.M., Campelo, J.M., Luna, D., Marinas, J.M., Romero, A.A., Hidalgo, J.M., Luque, R., Macario, A., Giordano, G., 2009. Sustainable preparation of a novel glycerol-free biofuel by using pig pancreatic lipase: partial 1,3-regiospecific alcoholysis of sunflower oil. *Process Biochem.* 44, 334–342.
- Camacho, F., Robles, A., Gonzalez, P.A., Camacho, B., Esteban, L., Molina, E., 2006. Mechanistic model for the lipase-catalyzed alcoholysis of triacylglycerols. *Appl. Catal. A* 301, 158–168.
- Corma, A., Huber, G.W., Sauvanud, L., O'Connor, P., 2007. Processing biomass-derived oxygenates in the oil refinery: catalytic cracking (FCC) reaction pathways and role of catalyst. *J. Catal.* 247, 307–327.
- Demirbas, A., 2009. Progress and recent trends in biodiesel fuels. *Energy Convers Manage* 50, 14–34.
- Desai, P.D., Dave, A.M., Devi, S., 2006. Alcoholysis of salicornia oil using free and covalently bound lipase onto chitosan beads. *Food Chem.* 95, 193–199.
- Diehl, B., Randel, G., 2007. Analysis of biodiesel, diesel and gasoline by NMR spectroscopy. A quick and robust alternative to NIR and GC. *Lipid Technol.* 19, 258–280.
- Dodds, D.R., Gross, R.A., 2007. Chemicals from biomass. *Science* 318, 1250–1251.
- Hernandez-Martín, E., Otero, C., 2008. Different enzyme requirements for the synthesis of biodiesel: Novozym-435 and lipozyme TL IM. *Bioresour. Technol.* 99, 277–286.
- Hsu, A., Jones, K., Foglia, T.A., Marmer, W.N., 2002. Immobilized lipase-catalysed production of alkyl esters of restaurant grease as biodiesel. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 36, 181–186.
- Knothe, G., 2006. Biodiesel and the issue of diesel fuel lubricity. *Lipid Technol.* 18, 105–108.
- Knothe, G., Steidley, K.R., 2007. Kinematic viscosity of biodiesel components (fatty acid alkyl esters) and related compounds at low temperatures. *Fuel* 86, 2560–2567.
- Kumar, R., Madras, G., Modak, J., 2004. Enzymatic synthesis of ethyl palmitate in supercritical carbon dioxide. *Ind. Eng. Chem. Res.* 43 (7), 1568–1573.
- Li, W., Du, W., Liu, D., 2007. *Rhizopus oryzae* IFO 4697 whole cell catalyzed methanolysis of crude and acidified rapeseed oils for biodiesel production in tert-butanol system. *Process Biochem.* 42, 1481–1485.

- Luque, R., Herrero-Davila, L., Campelo, J.M., Clark, J.H., Hidalgo, J.M., Luna, D., Marinas, J.M., Romero, A.A., 2008. Biofuels: a technological perspective. *Energy Environ. Sci.* 1, 513–596.
- Melero, J.A., Iglesias, J., Morales, J., 2009. Heterogeneous acid catalysts for biodiesel production: current status and future challenges. *Green Chem.* 11, 1285–1308.
- Modi, M.K., Reddy, J.R.C., Rao, B.V.S.K., Prasad, R.B.N., 2007. Lipase-mediated conversion of vegetable oils into biodiesel using ethyl acetate as acyl acceptor. *Bioresour. Technol.* 98, 1260–1264.
- Paula, A.V., Urioste, D., Santos, J.C., de Castro, H.F., 2007. Porcine pancreatic lipase immobilized on polysiloxane-polyvinyl alcohol hybrid matrix: catalytic properties and feasibility to mediate synthesis of surfactants and biodiesel. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 82, 281–288.
- Pinto, A.C., Guarieiro, L.L.N., Rezende, M.J.C., Ribeiro, N.M., Torres, E.A., Lopes, W.A., 2005. Biodiesel: an overview. *J. Braz. Chem. Soc.* 16, 1313–1330.
- Prestes, R.A., Colnago, L.A., Forato, L.A., Vizzotto, L., Novotny, E.H., Carrilho, E., 2007. A rapid and automated low resolution NMR method to analyze oil quality in intact oilseeds. *Anal. Chim. Acta* 596, 325–329.
- Ranganathan, S.V., Narasimhan, S.L., Muthukumar, K., 2008. An overview of enzymatic production of biodiesel. *Bioresour. Technol.* 99, 3975–3981.
- Rathore, V., Madras, G., 2007. Synthesis of biodiesel from edible and non-edible oils in supercritical alcohols and enzymatic synthesis in supercritical carbon dioxide. *Fuel* 86, 2650–2659.
- Royon, D., Daz, M., Ellenrieder, G., Locatelli, S., 2007. Enzymatic production of biodiesel from cotton seed oil using t-butanol as a solvent. *Bioresour. Technol.* 98, 648–653.
- Salis, A., Pinna, M., Monduzzi, M., Solinas, V., 2005. Biodiesel production from triolein and short chain alcohols through biocatalysis. *J. Biotechnol.* 119, 291–299.
- Salis, A., Monduzzi, M., Solinas, V., 2007. Use of lipases for the production of biodiesel. In: Polaina, J., MacCabe, A.P. (Eds.), *Industrial Enzymes. Structure, Function and Applications*. Springer, Amsterdam, Netherlands, pp. 317–339.
- Shah, S., Gupta, M.N., 2007. Lipase catalyzed preparation of biodiesel from Jatropha oil in a solvent free system. *Process Biochem.* 42, 409–414.
- Shieh, C.J., Liao, H., Lee, C.C., 2003. Optimization of lipase-catalyzed biodiesel by response surface methodology. *Bioresour. Technol.* 88, 103–106.
- Van Gerpen, J., 2005. Biodiesel processing and production. *Fuel Process Technol.* 86, 1097–1107.
- Verziu, M., Cojocaru, B., Hu, J., Richards, R., Ciuculescu, C., Filip, P., Parvulescu, V.I., 2008. Sunflower and rapeseed oil transesterification to biodiesel over different nanocrystalline MgO catalysts. *Green Chem.* 10, 373–381.
- Vicente, G., Martinez, M., Aracil, J., 2007. Optimisation of integrated biodiesel production. Part I. A study of the biodiesel purity and yield. *Bioresour. Technol.* 98, 1724–1733.
- Vlahov, G., 2006. ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy to determine olive oil grades. *Anal. Chim. Acta* 577, 281–287.
- Watanabe, Y., Shimada, Y., Sugihara, A., Noda, H., Fukuda, H., Tominaga, Y., 2000. Continuous production of biodiesel fuel from vegetable oil using immobilized *Candida antarctica* lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 77, 355–360.
- Wehtje, E., Adlercreutz, P., 2000. Water activity and substrate concentration effects on lipase activity. *Biotechnol. Bioeng.* 55, 798–806.
- Yazdani, S.S., Gonzalez, R., 2007. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. *Curr. Opin. Biotechnol.* 18, 213–219.

