



PONTIFICIA UNIVERSIDAD
CATOLICA
DE VALPARAISO



UNIVERSIDAD TECNICA
FEDERICO SANTA MARIA

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE VALPARAÍSO
UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA
PROGRAMA CONJUNTO DE DOCTORADO EN BIOTECNOLOGÍA

USM. BIBLIOTECA CENTRAL



3560900198753

**“DESARROLLO DE ESTRATEGIAS PARA EL AUMENTO DEL RENDIMIENTO DE
CONVERSIÓN A ALQUIL ÉSTERES DE ÁCIDOS GRASOS (BIODIESEL)
MEDIANTE EL USO DE CLEA_s DE LIPASA COMO CATALIZADOR DE LA
REACCIÓN DE TRANSESTERIFICACIÓN A PARTIR DE ACEITE DE RAPS
CANOLA”**

U.T.F.S.M.
BIBLIOTECA CENTRAL

Candidato a Doctor: Eduardo Caballero Valdés

Director de Tesis: Germán Aroca Arcaya

Co-Director de Tesis: Lorena Wilson Soto

(enero) 2011

Comisión

La presente tesis ha sido revisada por una comisión compuesta por:

Andrés Illanes

(Presidente de la comisión evaluadora, PUCV)

Manuel Young

(Profesor del Programa de Doctorado en Biotecnología, UTFSM)

Carolina Aguirre

(Profesor en calidad de evaluador externo, UCSC)

Rodrigo Navia

(Profesor en calidad de evaluador externo, UFRO)

Dedicatoria

Dedico este esfuerzo a mi señora Daniella, a mis padres y hermanos, sin cuya ayuda los obstáculos habrían parecido aún mayores. Gracias por hacerme el camino más transitable y perdón por el tiempo que no les dediqué tratando de saltar las bayas de un circuito que voluntariamente escogí y en el que orgullosa y finalmente no claudiqué.

Resumen

Debido al inminente agotamiento de las reservas de petróleo se ha desarrollado una gran cantidad de proyectos destinados a la generación de biocombustibles como energías alternativas renovables, dentro de los cuales se encuentra el biodiesel (alquil ésteres de ácidos grasos), el que se produce principalmente mediante la transesterificación de triglicéridos con un alcohol en presencia de un catalizador.

Se ha planteado como hipótesis que la máxima conversión de alquil ésteres de ácidos grasos usando agregados enzimáticos entrecruzados (CLEAs) de lipasa como biocatalizadores se ve incrementada al evitar el contacto de éste con glicerol, siendo el objetivo general la obtención de un CLEA de lipasa capaz de llevar a cabo la producción de biodiesel a altos rendimientos de conversión (>92%).

Los objetivos específicos incluyen la selección de una lipasa no inmovilizada, la determinación de las condiciones para la preparación de CLEAs, la obtención de las mejores condiciones de producción de biodiesel y la evaluación de la adición de una superficie hidrofílica al medio de reacción o el uso de CLEAs con superficie hidrofóbica respecto al rendimiento de conversión de biodiesel.

Las principales metodologías para llevar a cabo las actividades han sido la medición de la actividad de síntesis del biocatalizador (donde se utiliza p-nitrofenolpalmitato y etanol como sustratos de la reacción de transesterificación) y la cuantificación de alquil ésteres de ácidos grasos mediante cromatografía de gases basada en la cuantificación de los ácidglicéridos remanentes en el medio de reacción.

Dentro de los resultados se destacan los siguientes: La selección de la lipasa PS de *Burkholderia cepacia* con una actividad de síntesis de $1290,7U_s/g_{proteína}$. La obtención de un CLEA con una actividad de síntesis óptima de $163,3U_s/g_{CLEA}$ preparado con polímeros de glutaraldehído a pH 11,2, concentración de glutaraldehído de 36,8mM y una razón enzima/albúmina de 18,4mg/mg, sin embargo, el rendimiento de conversión obtenido con este CLEA es de 72,9%p/p. La adición de una superficie hidrofílica no catalítica al medio de reacción, logrando obtener un máximo rendimiento de conversión de 91,3%p/p usando un 34,2% de sílica gel y 10% de CLEA de lipasa. La preparación de un CLEA de lipasa con superficie hidrofóbica, logrando una conversión máxima de 97%p/p con un CLEA preparado con hexametilenediamina (HMDA) como agente de entrecruzamiento y propiltrietoxisilano (PTES) para hidrofobizar la superficie. Éste biocatalizador ha sido reutilizado, obteniendo un 94,5%p/p de conversión en el segundo lote de reacción y un 93,2%p/p de conversión en el tercero.

Según los resultados obtenidos se puede mencionar que la selección de la lipasa utilizando la actividad de síntesis como criterio, se presenta como un método fácil, rápido y bien correlacionado con los resultados de otros autores. Respecto a la optimización de las condiciones para la preparación de un CLEA de lipasa, se ha logrado establecer que el uso de polímeros de glutaraldehído tiene un efecto positivo en la actividad de síntesis del biocatalizador. Por otra parte, tanto la adición de una superficie hidrofílica (sílica gel) en el medio de reacción como el uso de un CLEA de lipasa con superficie hidrofóbica, generan un aumento del rendimiento de conversión de biodiesel al evitar el contacto de la superficie del biocatalizador con el glicerol, el que incrementaría la incidencia de las restricciones difusionales externas.

Finalmente, se concluye que la hipótesis ha sido apropiadamente contrastada y verificada, obteniendo como mejor resultado la elaboración del CLEA con superficie hidrofóbica preparado con HMDA y PTES, el que se presenta como un biocatalizador que logra altos rendimientos de conversión y puede ser reutilizado sin perder mayormente su potencial catalítico.

Abstract

Due to the imminent exhaustion of oil reserves, a great number of projects aimed at the production of biodiesel, as an alternative renewable energy, has been developed, among which is the biodiesel (fatty acid alkyl esters), which is mainly produced by means of transesterification of triglycerides with an alcohol in presence of a catalyst.

The hypothesis is that the maximum conversion of fatty acid alkyl esters, using cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of lipase as biocatalysts, is increased as it avoids its contact with glycerol. The general objective is obtaining a CLEA of lipase able to produce biodiesel at a high conversion yields (>92%).

The specific objectives are selecting a non-immobilized lipase, finding the conditions for preparing CLEAs, obtaining the best conditions for biodiesel production, determining the effect of adding a hydrophilic surface in the reaction medium on the biodiesel conversion yield, and determining the effect of using CLEAs with hydrophobic surface on the biodiesel conversion.

The main methodologies to carry out the activities have been measuring the synthesis activity of the biocatalyst (where p-Nitrophenyl palmitate and ethanol are used as substrates for the transesterification reaction), and quantifying fatty acid alkyl esters by means of gas chromatography based on the quantification of the acylglycerols remaining in the reaction medium.

The following results stand out: The selection of PS lipase *Burkholderia cepacia* with a synthesis activity of 1290.7U_s/g_{protein}. Obtaining a CLEA with an optimum synthesis activity of 163.3U_s/g_{CLEA}, prepared with glutaraldehyde polymers at pH 11.2, a glutaraldehyde concentration of 36.8mM and an enzyme/albumin ratio of 18.4mg/mg; however, the conversion yield obtained with this CLEA is 72.9%p/p. The addition of a non-catalytic hydrophilic surface into the reaction medium allow to obtaining a maximum conversion yield of 91.3%p/p, using 34.2% of silica gel and 10% of CLEA of lipase. The preparation of a CLEA of lipase with hydrophobic surface, obtaining a maximum conversion of 97%p/p with a CLEA prepared with Hexamethylene Diamine (HMDA) as cross-linking reagent, and propyltriethoxysilane (PTES) to make the surface hydrophobic. This biocatalyst has been reused, obtaining a conversion of 94.5%p/p in the second reaction batch, and a conversion of 93.2%p/p in the third batch.

According to the results obtained, we may mention that using the synthesis activity as criterion to select a lipase is an easy, quick and well correlated with the results of other authors. As to the optimisation of the conditions to prepare a CLEA of lipase, it has been established that the use of glutaraldehyde polymers has a positive effect on the biocatalyst synthesis activity. On the other hand, both adding an hydrophilic surface (silica gel) into the reaction medium and using a CLEA of lipase with hydrophobic surface increase the biodiesel conversion yield as they avoid the contact between the biocatalyst surface and glycerol, which would increase the incidence of the external difussional restrictions.

Finally, we conclude that the hypothesis has been properly contrasted and verified, obtaining as a better result the preparation of CLEA with hydrophobic surface prepared with HMDA and PTES, which is a biocatalyst that may achieve high conversion yields and may be reused without significantly losing its catalytic potential.

Agradecimientos

Especialmente agradezco a mi esposa Daniella, a mis padres Vicente y María y a mis hermanos David y Pamela por el sustento anímico, afectivo y moral que fueron esenciales en los momentos difíciles.

Por otra parte, agradezco el apoyo tanto técnico como moral a los compañeros del laboratorio de biocatálisis (Rosy, Jessica, Cecilia, Carlos, Martín, Pedro, Valeria, Lorena, Oscar y Nicole), a los compañeros de post grado (Araceli, Carmen, Lorena, Romina, Mauricio, Igor y Zaida) y a Catalina por el apoyo técnico.

A los profesores guía Dra. Lorena Wilson y Dr. Germán Aroca, quienes han entregado un gran apoyo tanto personal como profesional para la obtención de un trabajo de gran innovación y calidad científica.

Al proyecto Alfa-BIOPROAM, por permitirme realizar una estadía en la Universidad de Gent, Bélgica, logrando llevar a cabo una de las etapas de la presente investigación. Se hacen extensivos los agradecimientos al Dr. Roland Verhè, el que mostró una gran disposición a colaborar en el desarrollo del estudio.

Al Dr. Martin Mittelbach y a todo su equipo por haberme recibido en su laboratorio en la Universidad Karl-Franzens, Graz, Austria.

A CONICYT, por otorgarme la Beca de Doctorado, que me ha permitido cursar los estudios de postgrado y la Beca de Apoyo a la Realización de Tesis Doctoral, que me ha dado la posibilidad de llevar a cabo las experiencias del presente estudio.

Índice General

Página

1 Introducción	1
1.1 Exposición general del problema y propuesta de investigación	1
1.2 Hipótesis.....	3
1.3 Objetivo General.....	4
1.4 Objetivos específicos.....	4
2 Revisión Bibliográfica	5
2.1 Antecedentes generales sobre biodiesel	5
2.2 Modalidad de producción de biodiesel	5
2.2.1 La pirólisis.....	6
2.2.2 La microemulsificación.....	6
2.2.3 La transesterificación.....	6
2.3 Sustratos de la Reacción de Transesterificación.....	10
2.3.1 Fuente de Triglicéridos	10
2.3.2 Aceptor de acilo	13
2.4 Lipasas	14
2.4.1 Clasificación y usos	14
2.4.2 Estructura y mecanismo de activación.....	15
2.5 Biocatalizadores utilizados en la producción de biodiesel.....	16
2.5.1 Lipasas extracelulares en síntesis de biodiesel.....	16
2.5.2 Mecanismo de reacción	18
2.5.3 Estrategias para el uso de biocatalizadores en la producción de biodiesel	21
2.5.4 Limitaciones de transferencia de masa interna y externa.....	24
2.5.5 Inmovilización de lipasas en producción de biodiesel	25
2.6 Inmovilización de enzimas sin uso de soporte	28
2.6.1 CLE	28
2.6.2 CLEC.....	29
2.6.3 CLEA.....	29
2.7 CLEAs de lipasa	35
3 Materiales y Métodos	38
3.1 Materiales.....	38
3.2 Metodología analítica.....	41
3.2.1 Determinación de actividad de síntesis.....	41
3.2.2 Determinación de actividad de hidrólisis	42
3.2.3 Determinación de proteína por BCA (ácido bicinconínico)	43
3.2.4 Microscopía óptica para determinación de tamaño de partícula de CLEAs de lipasa	45
3.2.5 Determinación de perfil de ácidos grasos	45
3.2.6 Determinación de mono, di y triglicéridos mediante cromatografía gaseosa.....	46
3.3 Metodología experimental.....	47
3.3.1 Estabilidad de los biocatalizadores en presencia de metanol.....	47
3.3.2 Determinación de cantidad de agente precipitante a utilizar en la elaboración de CLEA.....	48

3.3.3 Polimerización de glutaraldehído	48
3.3.4 Oxidación de dextrano para el uso como agente de entrecruzamiento	49
3.3.5 Metodología para la producción de CLEA	49
3.3.6 Metodología de superficie respuesta (MSR)	50
3.3.7 Cuantificación de la actividad residual de hidrólisis en el CLEA de lipasa luego de inactivación térmica	52
3.3.8 Metodología para la producción de CLEA hidrofóbico.....	53
3.3.9 Reacción de transesterificación en modalidad por lote	54
3.3.10 Optimización de la síntesis de biodiesel.....	55
4 Resultados	57
4.1 Determinación de actividad específica de síntesis y estabilidad en hexano anhidro y presencia de metanol.....	57
4.2 Determinación de las condiciones iniciales de elaboración de CLEAs previo a la optimización de la actividad de síntesis	58
4.2.1 Cuantificación de lisinas en la superficie de lipasa PS.....	58
4.2.2 Estabilidad de la solución enzimática de la lipasa PS a distintos valores de pH.....	59
4.2.3 Requerimiento de agente precipitante	60
4.3 Optimización de las variables involucradas en la elaboración de CLEAs de lipasa PS evaluando el efecto del pH de la solución de glutaraldehído como agente de entrecruzamiento	63
4.4 Evaluación del uso de dextrano aldehído (DPA) como agente de entrecruzamiento.....	72
4.5 Determinación de las variables implicadas en la producción de biodiesel con CLEAs de lipasa a partir de aceite de raps canola.....	75
4.5.1 Caracterización del aceite de raps canola.....	75
4.5.2 Determinación del medio de reacción para la producción de biodiesel usando CLEA de lipasa PS.....	76
4.5.3 Determinación de la temperatura de reacción y razón E/S empleado para la producción de biodiesel	80
4.6 Estrategias de aumento de la conversión de alquil ésteres de ácidos grasos de aceite de raps/canola	82
4.6.1 Adición de etanol en pasos sucesivos	82
4.6.2 Adición de sílica gel al medio de reacción.....	83
4.6.3 Lavados del CLEA de lipasa PS previo a su reutilización	84
4.6.4 Elaboración de CLEAs de lipasa con superficie hidrofóbica.....	85
5 Discusión	91
5.1 Selección de lipasa para su uso en la producción de biodiesel.....	91
5.2 Determinación de las condiciones iniciales de elaboración de CLEAs previo a la optimización de la actividad de síntesis	92
5.3 Optimización de la actividad de transesterificación de CLEAs de lipasa PS entrecruzado con glutaraldehído.....	93
5.4 Utilización de dextrano aldehído como agente de entrecruzamiento.....	96
5.5 Variables implicadas en la producción de biodiesel con CLEA óptimo.....	97
5.6 Estrategias de aumento de la conversión de alquil ésteres de ácidos grasos de aceite de raps/canola	100
6 Conclusión	107

7 Recomendaciones 109

Referencias 111

Anexos 125

Índice de Tablas

	Página
Tabla 2.1 Perfil de ácidos grasos de aceites vegetales empleados en la producción de biodiesel.....	12
Tabla 2.2 Lipasas extracelulares aplicadas a la producción de biodiesel.....	17
Tabla 2.3 Soportes utilizados en la inmovilización de lipasas para la producción de biodiesel.....	27
Tabla 2.4 Preparación de CLEAs de distintas enzima.....	34
Tabla 3.1 Lipasas comerciales en formato sólido sin inmovilizar utilizadas en el estudio.....	38
Tabla 3.2 Principales compuestos utilizados para llevar a cabo las experiencias.....	39
Tabla 3.3 Equipos utilizados para el desarrollo de la tesis.....	40
Tabla 3.4 Diseño central compuesto para tres variables codificadas independientes.....	52
Tabla 3.5 Equivalencia de los niveles con los valores que adquiere cada variable.....	52
Tabla 3.6 Diseño factorial 2^4 para encontrar las mejores condiciones de producción de biodiesel.....	56
Tabla 4.1 Caracterización de las lipasas comerciales estudiadas respecto a su contenido de proteína, actividad de síntesis y tiempos de vida media de inactivaciones en hexano anhidro a 40°C con 27 g/L de metanol.....	57
Tabla 4.2 Resultados del diseño central compuesto considerando la medición del tamaño de partícula y la actividad de síntesis e hidrólisis de los CLEAs de lipasa PS.....	64
Tabla 4.3 Estabilidad de los CLEAs del diseño central compuesto a las 50h y una temperatura de 60°C.....	69

Tabla 4.4 Actividades de hidrólisis y síntesis de CLEA a distintas razones enzima/albúmina. Los CLEA presentados han sido preparados con glutaraldehído a pH 11,2.....	70
Tabla 4.5 Actividades residuales de la suspensión de CLEA y actividad residual en el CLEA al ser sometido a inactivación térmica a 60°C por 50 h. Los CLEAs de lipasa PS presentan distintas razones enzima/albúmina y han sido preparados con glutaraldehído a pH 11,2	70
Tabla 4.6 Actividad de hidrólisis y tamaño de partícula de CLEAs de lipasa PS entrecruzados con dextrano aldehído.....	73
Tabla 4.7 Actividades residuales de la suspensión de CLEA y actividad residual en el CLEA al ser sometido a inactivación térmica a 60°C por 50 h. Los CLEAs de lipasa PS han sido preparados con dextrano aldehído como agente de entrecruzamiento.....	74
Tabla 4.8 Perfil de ácidos grasos del aceite de raps canola refinado.	75
Tabla 4.9 Ácidos grasos libres y rendimiento de conversión de AEAG usando distintos medios de reacción. Las reacciones fueron llevadas a cabo a 40°C con una razón alcohol/aceite de 4:1 y una razón E/S de 0,1	79
Tabla 4.10 Efecto de la adición de sílica gel al inicio de la reacción sobre el rendimiento de conversión de biodiesel. Las reacciones se realizaron a una temperatura de 40°C, una razón molar etanol/aceite de 4:1, una razón E/S de 0,1 y un tiempo de reacción de 20h.....	84
Tabla 4.11 Caracterización de CLEAs de lipasa PS con superficie hidrofóbica.....	86
Tabla 4.12 Efecto del agente de entrecruzamiento y adición de alcoxisilanos en el rendimiento de conversión de EEAG y acilglicéridos (TG, DG y MG) remanentes en la mezcla luego de 20h de reacción.....	87
Tabla 4.13 Caracterización del CLEA PTES HMDA durante la reacción de transesterificación.....	90

Índice de Figuras

	Página
Figura 2.1 Ecuación general de la reacción de transesterificación. R1, R2 y R3 representan las cadenas de ácidos grasos del triglicérido. R' es el grupo alquilo del alcohol utilizado (en el caso de metanol R' = CH ₃).....	7
Figura 2.2 Diagrama de flujo del proceso de transesterificación catalizado por lipasa.....	10
Figura 2.3 Principales aceites usados en la producción de biodiesel en Europa.....	11
Figura 2.4 Mecanismo Ping-Pong Bi Bi para la reacción de transesterificación catalizada por lipasas (Al-Zuhair, 2006).....	18
Figura 2.5 Mecanismo de producción enzimática de biodiesel a partir de triglicéridos (Al-Zuhair et al., 2007).....	19
Figura 2.6 Esquema de la preparación de CLEAs considerando las principales etapas del proceso, como son la precipitación y el entrecruzamiento.....	30
Figura 2.7 Molécula de dextrano.....	32
Figura 2.8 Polimerización de glutaraldehído y entrecruzamiento con proteínas. P ₁ y P ₂ representan proteínas (Wong, 1993).....	33
Figura 4.1 Vista delantera (arriba) y trasera (abajo) de la superficie de lipasa de B. cepacia mostrando los residuos de lisina en rojo y los aminoácidos del sitio activo en azul (Serina 87, Ácido aspártico 264, Histidina 286).....	59
Figura 4.2 Estabilidad de la lipasa PS a 40°C y distintos valores de pH. Las curvas representan el porcentaje de actividad de hidrólisis de la suspensión función del tiempo y respecto a la actividad inicial.....	60
Figura 4.3 Agente precipitante necesario para precipitar la lipasa desde una solución enzimática. La experiencia de precipitación se realizó a 4°C.....	61
Figura 4.4 Rendimientos de inmovilización con distintos agentes precipitantes. SA: Sulfato de amonio, TB: tert-butanol, PG600: Polietilenglicol 600, AC: Acetona. La razón enzima/albúmana es de 10mg/mg, el glutaraldehído se encuentra a pH 2,8 y la concentración del glutaraldehído es de 25mM.....	62

Figura 4.5 Superficie de respuesta resultante al mantener constante la variable pH en el valor 11,2.....	68
Figura 4.6 Inactivación térmica a 60°C de la suspensión de CLEAs preparado con glutaraldehído a pH 11,2 y distintas razones enzima/albúmina y concentraciones de glutaraldehído.....	71
Figura 4.7 Selección de la concentración del agente de entrecruzamiento (DPA) en función de la actividad de síntesis del CLEA de lipasa resultante. Las experiencias se realizaron a partir de una solución de lipasa PS 50mg/mL en tampón fosfato 25mM pH 7,0 a una temperatura de 4°C.....	73
Figura 4.8 Cinética de producción de biodiesel a 40°C, una razón molar metanol/aceite de 4:1 y una razón E/S de 0,1.....	77
Figura 4.9 Cinética de producción de biodiesel a 40°C, una razón molar etanol/aceite de 4:1 y una razón E/S de 0,1.....	78
Figura 4.10 Efecto de la temperatura en la cinética de producción de biodiesel con una razón E/S de 0,1 y una razón molar alcohol:aceite de 4:1	80
Figura 4.11 Cinéticas de producción de biodiesel a distintas razones E/S. Las reacciones se realizaron a una razón molar etanol:aceite de 4:1 y una temperatura de 40°C.....	81
Figura 4.12 Cinéticas de producción de biodiesel y de producción y consumo de acilglicéridos a 40°C y razón E/S de 0,1. EEAG: etil ésteres de ácidos grasos. Los acilglicéridos son: triglicéridos (TG), diglicéridos (DG) monoglicéridos (MG).....	82
Figura 4.13 Adición de etanol en pasos sucesivos al medio de reacción. Se agrega el primer equivalente molar de etanol a tiempo cero. Las flechas indican la adición de un equivalente molar de etanol al medio de reacción. Reacción a 40°C y razón E/S de 0,1.....	83
Figura 4.14 Cinéticas de producción de biodiesel a distintas razones E/S. Las reacciones se realizaron a una razón molar etanol:aceite de 4:1, una temperatura de 40°C y una cantidad de sílica gel de 20% respecto a la masa de aceite.....	84
Figura 4.15 Evaluación de la reutilización de biocatalizadores lavados con <i>tert</i> -butanol. Reacciones realizadas a 40°C, razón molar etanol:aceite de 4:1.....	85
Figura 4.16 Superficie de lipasa de <i>Burkholderia cepacia</i> mostrando los residuos de treonina, tirosina y serina (en color naranja) cuyas cadenas laterales poseen grupos hidroxilo que pueden ser oxidados a aldehídos.....	88

Figura 4.17 Cinéticas de producción de biodiesel y de producción y consumo de acilglicerolos a 40°C, una razón E/S de 0,1 con CLEA PTES-HMDA y una razón etanol:aceite de 4:1. EEAG: etil ésteres de ácidos grasos. Acilglicéridos: triglicéridos (TG), diglicéridos (DG) y monoglicéridos (MG). 89

1 Introducción

1.1 Exposición general del problema y propuesta de investigación

La demanda de energía ha aumentado debido al rápido crecimiento de la población y urbanización. Debido a que las más importantes fuentes de energía como el carbón, el petróleo y el gas natural están siendo gradualmente agotadas, los biocombustibles están emergiendo como una de las opciones energéticas renovables más promisorias y ambientalmente amigables. Actualmente los combustibles fósiles representan sobre el 80% del total del suministro energético a nivel mundial, pero se hace cada vez más clara la tendencia hacia nuevas fuentes de energía gracias al promisorio desarrollo tecnológico de la última década. De los combustible no renovables, el petróleo es el que se encuentra en mayor peligro de agotarse, estimándose que podría llegar a un máximo en el consumo global de petróleo entre el 2015 y 2030 (Demirbas, 2008). Estos hechos hacen pensar que en un mediano plazo se llegaría al agotamiento total del combustible producido a partir de petróleo.

Los combustibles alternativos renovables, dentro de los cuales se encuentra el bioetanol, biohidrógeno y biodiesel, representan una de las soluciones propuestas frente a los problemas de abastecimiento energético. Algunas de las ventajas de estos biocombustibles son las siguientes: 1) están fácilmente disponibles en fuentes de biomasa. 2) al llevarse a cabo la combustión, se completa el ciclo del dióxido de carbono. 3) son biodegradables y contribuyen a la sustentabilidad (Puppan, 2002).

Dentro de estos biocombustibles, el biodiesel se destaca dentro del ámbito del transporte, ya que puede ser usado para reemplazar al diesel derivado del petróleo, el que es usado comunmente en los medios de transporte público en las ciudades. La producción de este biocombustible es llevada a cabo mediante un proceso de transesterificación en el que se hace reaccionar un alcohol con los triglicéridos presentes generalmente en aceites de origen vegetal, generando alquil ésteres de ácidos grasos (biodiesel) (Knothe, 2006).

La síntesis de biodiesel requiere generalmente de la presencia de un catalizador, utilizándose

catalizadores químicos y catalizadores biológicos o biocatalizadores. El proceso de transesterificación catalizado químicamente presenta desventajas operacionales respecto a la alternativa que utiliza biocatalizadores (específicamente lipasas). Al utilizar un catalizador alcalino en la reacción de transesterificación de un aceite que contenga agua y ácidos grasos libres (aceites no refinados o aceites residuales de fritura) con metanol, se producen sales alcalinas de ácidos grasos (jabones) y debido a que el catalizador químico permanece soluble, los productos de la reacción terminan con un contenido de catalizador que debe ser lavado, generando un efluente alcalino que debe ser tratado (Shimada *et al.*, 2002; Canakci y Van Gerpen, 2001), traducándose en un costo ambiental y operacional.

Por otra parte, el costo de los biocatalizadores es muy superior al del catalizador químico y se hace difícil obtener altos rendimientos de conversión de alquil ésteres de ácidos grasos, lo que representa una de las mayores limitaciones a la hora de decidirse por los procesos catalizados por enzimas. De esta manera, las investigaciones respecto al uso de biocatalizadores en la producción de biodiesel buscan que las lipasas usadas no se inactiven en presencia de alcoholes como metanol (Kaieda *et al.*, 2001) o etanol, puedan evitar los efectos negativos de la presencia de glicerol sobre el rendimiento de conversión de alquil ésteres de ácidos grasos (Bako *et al.*, 2002), y puedan reutilizarse, lo que implica el uso de métodos de inmovilización.

Para que el proceso catalizado por lipasas pueda competir en términos económicos y productivos con el proceso llevado a cabo mediante catálisis química, se debe reducir el costo de los biocatalizadores, aumentar el rendimiento de conversión y disminuir los tiempos de reacción. A modo de ejemplo, se sabe que la lipasa de *Pseudomonas cepacia* (actualmente *Burkholderia cepacia*) inmovilizada (Amano Enzyme) tiene un costo de 1000[US\$/kg], mientras que la misma lipasa sin inmovilizar tiene un costo de 600[US\$/kg]^{*}. De esta forma, el presente proyecto se enfocará en el desarrollo de un biocatalizador inmovilizado sin uso de soporte (disminuyendo los costos por éste concepto), que pueda generar altos rendimientos de conversión y evitar los efectos negativos del alcohol y del glicerol. Para tal efecto se ha propuesto la elaboración de CLEAs (agregados enzimáticos entrecruzados) de lipasa, metodología de inmovilización que permite obtener un biocatalizador con alta actividad específica y que evita el uso de soportes (Cao *et al.*, 2000; Cao *et al.*, 2001; Kumari *et al.*, 2007). Dicho método de inmovilización es una técnica simple que consiste básicamente en el entrecruzamiento covalente de una enzima precipitada. El presente estudio se focalizará en encontrar las condiciones de elaboración del CLEA de lipasa que posteriormente, al aplicarlo

^{*} Sam Lazar, Ejecutivo de ventas Amano Enzyme S.A.

en el proceso de transesterificación, permita la obtención de rendimientos de conversión de metil ésteres mayores a 92%p/p (Kumari *et al.*, 2007). Al respecto sólo el estudio realizado por Kumari y colaboradores (2007) ha usado CLEAs de lipasa para su utilización en la producción de biodiesel, mostrándose como una buena alternativa que merece ser optimizada y estudiada en profundidad.

Teniendo en cuenta lo anterior, el presente estudio considerará tres estrategias enfocadas a alcanzar el objetivo general. **La primera** será la optimización de la actividad de transesterificación del CLEA convencional (basado en la metodología presentada en Kumari *et al.*, 2007) mediante el estudio de las variables involucradas en el proceso de elaboración del biocatalizador. Debido a que el glicerol (de naturaleza hidrofílica) estaría afectando negativamente la acción catalítica de las lipasas inmovilizadas al depositarse en su superficie, la segunda y tercera estrategias se encuentran enfocadas en evitar el contacto de este subproducto de la transesterificación con el CLEA de lipasa. Específicamente, **la segunda** estrategia implicaría la incorporación de sílica gel al medio de reacción de transesterificación de aceite de raps canola. La sílica gel posee una superficie hidrofílica (Blanco *et al.*, 2007) que podría adsorber el glicerol producido en el transcurso de la reacción, permitiendo que el CLEA de lipasa continúe su acción catalítica y la obtención de altos rendimientos de conversión. Por otra parte, se ha encontrado que es posible la elaboración de CLEAs con superficie hidrofóbica (Schoevaart *et al.*, 2008). Según lo anterior, se propone **la tercera** estrategia, que involucra encontrar las mejores condiciones para la elaboración de un CLEA hidrofóbico de lipasa que será posteriormente evaluado en la reacción de transesterificación de aceite de raps canola. Debido a que el glicerol es hidrofílico y la superficie del CLEA de lipasa sería hidrofóbica, el glicerol no se adsorbería en la superficie de éste, permitiéndole continuar la catálisis de la reacción, obteniendo finalmente un alto rendimiento de conversión.

En base a la propuesta enunciada se presenta la siguiente hipótesis de trabajo.

1.2 Hipótesis

La máxima conversión de alquil ésteres de ácidos grasos (biodiesel) usando CLEAs de lipasa como biocatalizadores se ve incrementada al evitar el contacto del biocatalizador con el glicerol, lo cual puede lograrse adicionando una superficie hidrofílica no catalítica al medio de reacción o generando un CLEA de lipasa con superficie hidrofóbica.

1.3 Objetivo General

Desarrollar una estrategia dirigida a aumentar la conversión de alquil ésteres de ácidos grasos por sobre 92%p/p usando CLEAs de lipasa como catalizador de la síntesis de biodiesel a partir de un alcohol y aceite de raps/canola.

1.4 Objetivos específicos

Objetivo 1: Seleccionar la lipasa libre (no inmovilizada) con mayor actividad específica de síntesis y estabilidad en presencia de metanol.

Objetivo 2: Determinar las condiciones de producción del CLEA (tipo de agente precipitante, tipo, tamaño y concentración de agente de entrecruzamiento y adición de albúmina) que maximicen su actividad específica de transesterificación y permita un buen entrecruzamiento.

Objetivo 3: Obtener las mejores condiciones de producción de biodiesel catalizado por el CLEA de lipasa seleccionado en el objetivo 2 en función del rendimiento de conversión de alquil ésteres de ácidos grasos.

Objetivo 5: Determinar el efecto de la adición de una superficie hidrofílica no catalítica (sílica gel) en el medio de reacción sobre el rendimiento de conversión de alquil ésteres de ácidos grasos.

Objetivo 6: Determinar el efecto del uso de un CLEA de lipasa con superficie hidrofóbica sobre la conversión de alquil ésteres de ácidos grasos.

2 Revisión Bibliográfica

2.1 Antecedentes generales sobre biodiesel

La conversión de aceites vegetales y grasas animales en biodiesel ha experimentado un gran desarrollo en los últimos años (Madras et al, 2004; Haas et al, 2006; Meher et al, 2006). Esto se ha debido principalmente a que este biocombustible posee un bajo poder contaminante y naturaleza renovable en contraposición al diesel convencional, el cual es un combustible fósil que puede agotarse debido a la progresiva disminución de sus reservas como consecuencia del aumento sostenido de su consumo (Ghadge y Raheman, 2006).

Desde un punto de vista químico, el biodiesel es una mezcla de alquil ésteres de ácidos grasos, los cuales se caracterizan porque sus propiedades tanto físicas como químicas son similares a las del diesel. Estas propiedades incluyen densidad, viscosidad, índice de yodo, índice de acidez, punto de turbidez, volatilidad y número de cetano entre otras. En términos energéticos, el biodiesel produce ligeramente menos energía y torque que el combustible diesel nº 2 (D2); sin embargo, el biodiesel es mejor que el diesel en términos de contenido de azufre, temperatura de inflamación, contenido de aromáticos y biodegradabilidad (Bala, 2005).

2.2 Modalidad de producción de biodiesel

La búsqueda de combustibles alternativos inicialmente analizó la posibilidad de uso de aceites vegetales directamente en motores diesel. Estos resultados mostraron ser insatisfactorios debido a un conjunto de problemáticas, dentro de las cuales se puede considerar la alta viscosidad del aceite, la composición y contenido de ácidos grasos libres en el aceite, la formación de gomas debido a la oxidación y polimerización durante el almacenamiento y combustión y los depósitos de carbono en el motor (Ma y Hanna, 1999).

Posteriormente se han abordado estrategias para la modificación de aceites para su utilización como biocombustible. A continuación se mencionan tres alternativas:

2.2.1 La pirólisis

Consiste en la aplicación de energía térmica para causar un cambio químico en los triglicéridos (TG) del aceite o materia grasa en presencia de aire o nitrógeno introducido en la fase líquida. El inconveniente de la pirólisis es que se generan grandes diferencias en la composición de los productos obtenidos dependiendo del tipo de aceite usado en el proceso. Además, se obtiene un producto químicamente muy similar a la gasolina derivada de petróleo y el combustible diesel, lo que elimina cualquier beneficio ambiental respecto a la reducción de emisiones gaseosas comparados con los derivados del petróleo (Ma y Hanna, 1999).

2.2.2 La microemulsificación

Son dispersiones isotrópicas, limpias y termodinámicamente estables de aceite, agua, surfactante y frecuentemente una pequeña molécula anfifílica llamada cosurfactante (Schwab *et al.*, 1987). El posible inconveniente de las microemulsiones es que produce depósitos de carbono, combustión incompleta y un aumento de la viscosidad del aceite lubricante (Ziejewski *et al.*, 1984).

2.2.3 La transesterificación

El biodiesel (alquil ésteres de ácidos grasos) es obtenido al llevar a cabo la reacción de transesterificación de los triglicéridos presentes en el aceite vegetal o la grasa animal. En esta reacción, el aceite vegetal o la grasa animal reacciona con un alcohol (aceptor de acilo) en presencia de un catalizador, dando como resultado los correspondientes alquil ésteres (etil ésteres en caso de usar etanol) de los ácidos grasos presentes en los triglicéridos del aceite o la grasa (Knothe, 2006). Esta reacción se puede observar en la Figura 2.1.

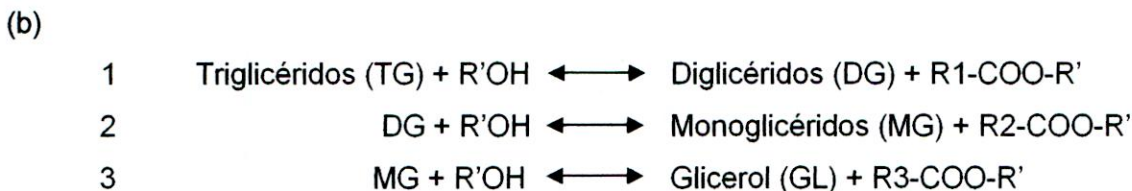
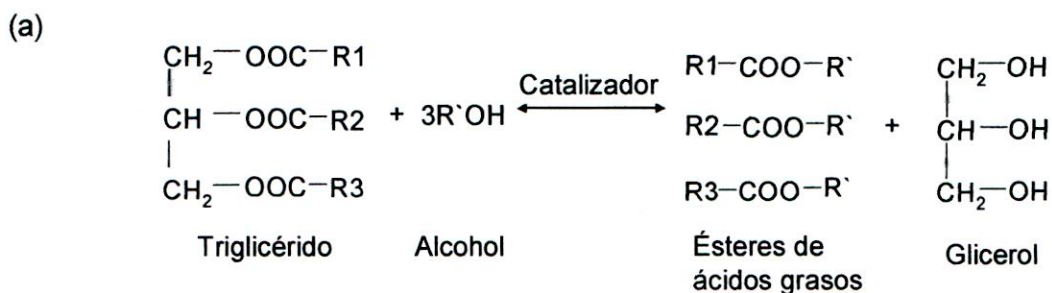


Figura 2.1 Ecuación general de la reacción de transesterificación (a). Reacciones consecutivas reversibles (b). R1, R2 y R3 representan las cadenas de ácidos grasos del triglicérido. R' es el grupo alquilo del alcohol utilizado (en el caso de etanol R' = CH₃CH₂).

El proceso de transesterificación puede ser catalizado por diversos agentes como: catalizadores químicos (alcalinos o ácidos) o biocatalizadores (enzima inmovilizada). También se puede llevar a cabo la reacción en ausencia de catalizadores, al usar alcoholes en estado supercrítico. A continuación se describen las tres posibles vías por las cuales se puede realizar la reacción de transesterificación.

Fluidos supercríticos: Esta modalidad no requiere de catalizador pero sí de fluidos como metanol supercrítico a 350°C (Saka y Kusdiana, 2001; Demirbas, 2005). Así mismo, se ha encontrado que temperaturas de reacción de 350°C y una razón molar de metanol:aceite de raps de 42:1 son las mejores condiciones para la producción de biodiesel (Kusdiana y Saka, 2001), siendo un proceso intensivo desde el punto de vista del gasto energético (necesidad de temperaturas elevadas) y que requiere un gran exceso de metanol.

Catálisis química: La reacción de transesterificación catalizada químicamente consiste en un número de reacciones consecutivas y teóricamente reversibles, donde el primer paso es la conversión de triglicéridos a diglicéridos, seguido por la conversión de diglicéridos a monoglicéridos y posteriormente de monoglicéridos a glicerol, dando como producto una

molécula de metil éster (en caso de usar metanol como aceptor de acilo) de cada uno de los glicéridos de cada paso de reacción (Noureddini y Zhu, 1997).

Las condiciones experimentales que se han estudiado han sido: la razón molar alcohol/aceite, concentración de catalizador, tipo de catalizador, tiempo de reacción y temperatura (Jeong *et al.*, 2004).

Respecto al tipo de catalizador químico, los catalizadores mayormente utilizados son: ácidos, como el ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido clorhídrico y ácidos sulfónicos orgánicos, bases, como el NaOH, KOH, carbonatos y alcóxidos como metóxido de sodio, etóxido de sodio, propóxido de sodio y butóxido de sodio. El catalizador ácido produce una transesterificación mucho más lenta. Sin embargo, la catálisis ácida permite trabajar con glicéridos que poseen un contenido relativamente alto de ácidos grasos libres y agua pero manteniendo bajas velocidades de reacción (Ma y Hanna, 1999).

Por otro lado, el catalizador alcalino presenta desventajas como la dificultad de recuperación de glicerol como subproducto debido a la saponificación del catalizador con los ácidos grasos libres presentes en la fuente de triglicéridos, la necesidad de remover residuos de sales, el uso intensivo de energía (síntesis a mayores temperaturas respecto a la síntesis enzimática), la remoción o evaporación de solventes orgánicos en caso de ser utilizado, la remoción del catalizador desde el producto final, el tratamiento de las aguas que contienen el catalizador removido y el requerimiento de uso de aceites refinados con muy baja cantidad de agua y ácidos grasos libres. A pesar de ello, la velocidad de la reacción es superior a la síntesis enzimática (Dorado *et al.*, 2004) y el catalizador usado tiene mucho menor costo que los biocatalizadores (lipasas). Cabe destacar que la transesterificación catalizada por compuestos alcalinos es afectada principalmente por variables como la presencia de humedad y ácidos grasos libres en el aceite usado como materia prima y la razón molar alcohol/aceite vegetal o grasa animal (Ma y Hanna, 1999).

Catálisis enzimática: La utilización de enzimas (lipasas) cumpliendo el rol de catalizadores de la reacción de transesterificación es una buena alternativa para la producción de biodiesel sin generación de residuos o efluentes contaminantes (Shimada *et al.*, 2002). Como catalizadores, las lipasas tienen las siguientes ventajas: No requieren del aceite refinado (con muy bajo contenido de ácidos grasos libres y agua) (Azócar *et al.*, 2010), esterifican tanto acilgliceroles (mono, di y triglicéridos) como ácidos grasos libres en un

paso, producen una corriente de glicerol con un mínimo contenido de agua, es factible la reutilización del biocatalizador al utilizar la enzima inmovilizada, y el proceso se lleva a cabo a temperaturas menores a las usadas con catalizadores químicos, lo que permite un ahorro energético (Shimada *et al.*, 2002). El principal inconveniente del uso de estos biocatalizadores es que su costo es muy superior al del catalizador químico; por esta razón, los principales objetivos que se persiguen en las investigaciones relacionadas con el uso de lipasas en la producción de biodiesel son: el desarrollo de biocatalizadores que puedan mantener su actividad catalítica en presencia de compuestos como el metanol (Kaieda *et al.*, 2001), el uso de lipasas intracelulares usando la célula completa a modo de biocatalizador (evitando el costo de separación y purificación de la enzima) (Ban *et al.*, 2001) o el uso de métodos de inmovilización para poder recuperar y reutilizar la enzima (Chang *et al.*, 2005; Dizge *et al.*, 2009; Orcaire *et al.*, 2006).

Desde el punto de vista operacional, el uso de lipasas presenta desventajas como el efecto negativo sobre la actividad por parte del metanol y el glicerol (Shimada *et al.*, 2002), teniendo que recurrir al uso de solventes en el medio de reacción (Su y Wei, 2008). A pesar de las desventajas mencionadas, algunas empresas ya han entrado al mercado de la producción de biodiesel catalizado por lipasas. En 2007, Lvming Co. Ltd. establecieron una línea de producción enzimática de biodiesel con una capacidad de 10000 toneladas en Shanghai, China. La producción empleó la metodología desarrollada por la Universidad de Tecnología Química de Beijing, que utiliza como catalizador la lipasa *Candida sp.* 99-125 (inmovilizada en membranas textiles), obteniendo un rendimiento de metil ésteres de ácidos grasos de 90% bajo condiciones óptimas. Otra empresa que realiza la producción enzimática de biodiesel en China es Hainabaichuan Co. Ltd. Esta empresa utiliza la tecnología desarrollada por la Universidad de Tsinghua, la que usa el biocatalizador comercial Novozyme 435 (Tan *et al.*, 2010).

El diagrama de bloques del proceso productivo de biodiesel catalizado por lipasas se muestra en la Figura 2.2.

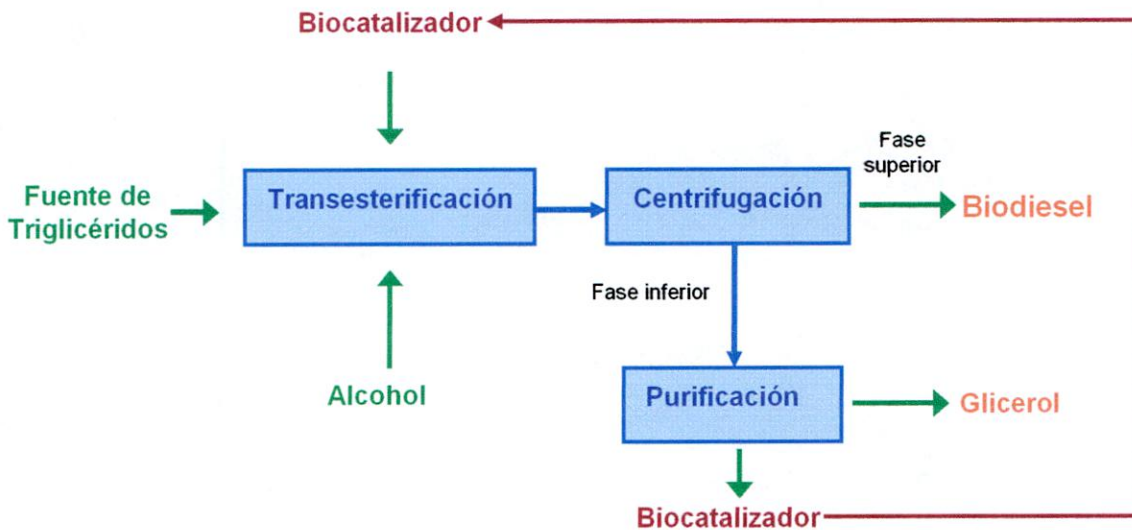


Figura 2.2 Diagrama de bloques del proceso de transesterificación catalizado por una lipasa inmovilizada

Dentro del ámbito del uso de biocatalizadores en la producción de biodiesel, es importante tener en cuenta la manera en que las enzimas influyen en la reacción de transesterificación. Al respecto existen estudios donde se investiga la cinética de transesterificación de triglicéridos con metanol catalizada por la lipasas. Los resultados indican que el mecanismo de reacción parece ajustarse a un mecanismo secuencial (Kaieda *et al.*, 1999).

2.3 Sustratos de la Reacción de Transesterificación

2.3.1 Fuente de Triglicéridos

El biodiesel puede ser producido a partir de una gran variedad de materias primas. Éstas incluyen a la mayoría de los aceites vegetales comunes provenientes de soya (Noureddini *et*

al., 2005), semilla de algodón (Köse *et al.*, 2002), palma, maní, raps canola (Jeong *et al.*, 2004), girasol, cártamo, jatrofa (Shah *et al.*, 2004), coco, y de grasas animales (usualmente sebo) así como residuos de aceites usados para frituras (Shimada *et al.*, 2002). Por otro lado, cabe mencionar que actualmente están siendo explotadas otras fuentes de aceites como los microorganismos oleaginosos, dentro de los cuales se encuentran levaduras (Li *et al.*, 2008a; Li *et al.*, 2007c) y microalgas (Amin, 2009; Huang *et al.*, 2010).

Dentro del ámbito nacional, se pueden destacar los estudios de la Fundación para la Innovación Agraria (FIA), los cuales determinan que la mayor cantidad de superficie cultivable en miras de una futura producción de biodiesel, se encuentra entre la VIII y X regiones, donde sería conveniente la producción de raps canola. Además, de acuerdo al Instituto de Biocombustibles de Austria, la tendencia en Europa es la producción industrial de biodiesel a partir de aceite de raps canola (como se muestra en la Figura 2.3). Por otra parte, existe un gran número de artículos científicos enfocados al estudio del biodiesel utilizando aceite de raps canola (Hajar *et al.*, 2009; Dizge *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2009; Dizge y Keskinler, 2008; Cheng *et al.*, 2010; Issariyakul *et al.*, 2008), lo que entrega un buen marco de referencia a la hora de comparar resultados y analizar las posibles ventajas del desarrollo de nuevos procedimientos en la producción de biodiesel.

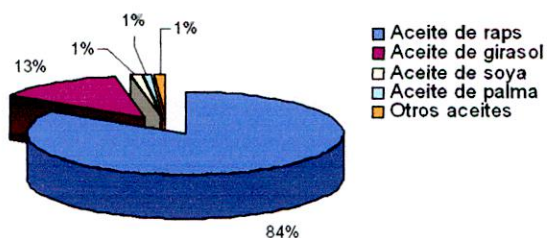


Figura 2.3 Principales aceites usados en la producción de biodiesel en Europa.

A continuación se muestra la Tabla 2.1 con la composición de algunos aceites enunciados anteriormente (Ma y Hanna, 1999).

Tabla 2.1 Perfil de ácidos grasos de aceites vegetales empleados en la producción de biodiesel

Fuente de aceite	Composición de ácidos grasos (%p/p)								
	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3	20:0	22:0	22:1	24:0
Maíz	11,7	1,9	25,2	60,6	0,5	0,2	0	0	0
Algodón	28,3	0,9	13,3	57,5	0	0	0	0	0
Crambe	2,1	0,7	18,9	9,0	6,9	2,1	0,8	58,5	1,1
Maní	11,4	2,4	48,3	31,9	0,9	1,3	2,5	0	1,2
Raps/Canola	3,5	0,9	64,4	22,3	8,2	0	0	0	0
Soya	11,8	3,2	23,3	55,5	6,3	0	0	0	0
Girasol	6,1	3,3	16,9	73,7	0	0	0	0	0

Respecto al perfil de ácidos grasos, el aceite de raps canola también presenta ventajas frente a la mayoría de las demás fuentes de triglicéridos. En general, un aceite con un perfil de ácidos grasos rico en ácido linolénico (C18:3) o ácido linoleico (C18:2) da como producto un metil éster más propenso a oxidación que un aceite cuyo contenido de ácidos grasos es rico en ácido oléico (C18:1) (como es el caso del aceite de raps canola). Además, los dobles enlaces están expuestos a reacciones de polimerización dando productos de mayor peso molecular, incrementando así la viscosidad de la mezcla y dando pie a la formación de especies insolubles que causan problemas en los motores al depositarse (Knothe, 2006).

Para la selección de la fuente de triglicéridos se debe considerar las propiedades y requerimientos del producto final. Al respecto, se ha observado que se obtiene un biodiesel con un número de cetano (NC) más bajo al tener presentes en la materia prima ácidos grasos con mayor número de insaturaciones y un NC más alto al tener un alquil éster con un largo de cadena mayor (Knothe, 2006). Esto nos lleva a la elección de un aceite que mantenga un equilibrio entre insaturaciones y largo de cadena, el que está presente en el caso del aceite de raps, que principalmente se compone de ácidos grasos de 18 carbonos y una insaturación.

Otro criterio para poder seleccionar la fuente de triglicéridos es el contenido de ácidos grasos saturados en el aceite, siendo las grasas de origen animal una fuente poco adecuada para llevar a cabo la producción de biodiesel. La desventaja de la presencia de ácidos grasos saturados es que cuando la temperatura desciende entre 0 y -2°C, los alquil ésteres de ácidos grasos saturados presentes en el biodiesel tienden a la nucleación de pequeños cristales. Estos cristales restringen el flujo a través de las líneas de combustible pudiendo

presentarse fallas en el motor (Knothe, 2006).

Del análisis anterior, se desprende que debe existir un equilibrio en el perfil de ácidos grasos de la fuente de triglicéridos seleccionados, con el fin de lograr un producto de alta calidad. Así, el aceite que se ajusta de mejor manera a los requerimientos señalados, es el aceite de raps canola, con el que se trabajará en la presente investigación.

2.3.2 Aceptor de acilo

En la reacción de transesterificación para la producción de biodiesel, los alcoholes con más de tres átomos de carbono se disuelven completamente en el aceite al ser agregados en cantidades estequiométricas, pero la solubilidad de metanol y etanol es 1/2 y 2/3 de la cantidad estequiométrica respectivamente. Según lo anterior, se presume que la baja conversión de metil ésteres de ácidos grasos es debido a la inhibición de la lipasa por contacto con el metanol o etanol insoluble en el aceite. El metanol es consumido completamente en la reacción de transesterificación de aceites vegetales con una cantidad de moles menor a 1/3 de la cantidad estequiométrica usando lipasa de *C. antarctica*, pero la conversión disminuye significativamente al adicionar una cantidad de moles equivalente a 1/2 de la cantidad estequiométrica (Shimada *et al.*, 2002).

Por otra parte, se ha investigado también el uso de alcoholes como 2-propanol (Modi *et al.*, 2006) y *n*-butanol (Sakai *et al.*, 2010), los que podrían entregar un mayor rendimiento de alquil ésteres de ácidos grasos; sin embargo, se debe tomar en cuenta que los rendimientos de alquil ésteres de ácidos grasos presentados en la mayoría de los artículos científicos se presentan en %p/p, siendo lógico encontrar rendimientos superiores mientras mayor sea el peso molecular del alcohol utilizado.

Otros estudios han utilizado alcoholes de mayor peso molecular. Un ejemplo de esto es un estudio realizado para llevar a cabo la transesterificación de aceite de raps con 2-etil-1-hexanol, alcanzando una conversión de ésteres de 97% p/p al usar lipasa en polvo de *Candida rugosa* como biocatalizador (Linko *et al.*, 1998).

De igual forma, se ha investigado el uso de alcoholes alifáticos en el rango C4-C18:1 usando lipasa inmovilizada de *Mucor miehei* (Lipozyme IM-20) en medio libre de solvente. De esta manera, se observó que el rango de conversión de ésteres se encontraba entre 86,8 y 99,2% p/p, y que el punto de fusión de los alquil ésteres aumentaba continuamente con el aumento del largo de la cadena del alcohol (desde C4 a C18) y disminuía al usar alcoholes con el mismo largo de cadena pero con una insaturación (como es el caso de C18 y C18:1) (De *et al.*, 1999). De esta forma, el producto final no tendría buenas propiedades para ser usado como combustible en motores, debido a que al bajar la temperatura se corre el peligro de que los ésteres de alquilo cristalicen, perjudicando el funcionamiento del motor. Lo anterior apoya la idea de la elección de metanol o etanol tomando en cuenta la calidad del producto final, adquiriendo mayor importancia el desarrollo de una estrategia para minimizar los efectos negativos de estos alcoholes sobre las lipasas.

En cuanto a los alcoholes usados en la reacción de transesterificación, se puede mencionar también el trabajo de Nelson y colaboradores (1996), en el que se llega a la conclusión de que la lipasa de *M. miehei* (lipasa inmovilizada Lipozyme IM60) es más eficiente para convertir triglicéridos a sus correspondientes alquil ésteres usando alcoholes primarios, mientras que la lipasa de *C. antarctica* (SP435) es más eficiente para transesterificar triglicéridos usando alcoholes secundarios, dando como resultado alquil ésteres ramificados. A pesar de obtener mejores resultados con alcoholes de tres o más átomos de carbono, éstos representan un mayor costo, haciéndose necesario encontrar otras estrategias que permitan el uso de metanol o etanol. Al respecto, el metanol es uno de los mayormente utilizados debido a su bajo costo, aunque en la actualidad el costo del etanol ha disminuido a niveles competitivos con el metanol debido al aumento de su producción como biocombustible (bioetanol).

2.4 Lipasas

2.4.1 Clasificación y usos

Las lipasas (carboxilesterasas o acilglicerol acilhidrolasas, EC 3.1.1.3) catalizan la hidrólisis reversible de triglicéridos a glicerol y ácidos grasos libres en medio acuoso.

Actualmente, se han encontrado aplicaciones del uso de lipasas para la síntesis de biopolímeros, biodiesel, producción de fármacos, agroquímicos enantioméricamente puros y compuestos saborizantes entre otros (Jaeger y Eggert, 2002).

Al utilizar lipasas en medios orgánicos o con baja actividad de agua el equilibrio termodinámico favorece a la síntesis sobre la hidrólisis, además de aumentar la estabilidad térmica de la enzima. Bajo estas condiciones, las lipasas pueden catalizar reacciones como la esterificación (entre un alcohol y un ácido carboxílico) y la transesterificación (intercambio de residuos de alcohol o ácido entre un éster y un acilo o alcoxilo), que dependiendo del dador de acilo se pueden subclasificar en acidólisis (cuando se usa un ácido), alcoholólisis (cuando se usa un alcohol) o interesterificación (cuando se usa otro éster) (Zaks, 1996).

Entre las principales razones por las que estos biocatalizadores son tan empleados en la industria biotecnológica se encuentra que:

- a Usualmente muestran una gran quimioselectividad, regioselectividad y estereoselectividad.
- b Están disponibles en grandes cantidades debido a que pueden ser producidas con altos rendimientos en microorganismos tales como hongos y bacterias.
- c Se ha dilucidado la estructura tridimensional de varias lipasas, facilitando considerablemente el diseño de estrategias de ingeniería de proteínas.
- d Usualmente no requieren de cofactores ni catalizan reacciones laterales.

Existen más de 130 biotransformaciones llevadas a cabo a nivel industrial por lipasas, la mayoría en el área de química fina e intermediarios farmacéuticos (Straathof *et al.*, 2002). En las últimas décadas se han realizado esfuerzos para desarrollar enzimas inmovilizadas en soportes con el objetivo de facilitar su uso en procesos continuos y especialmente para minimizar los costos, facilitando la separación y reutilización del biocatalizador.

2.4.2 Estructura y mecanismo de activación

Una de las principales características de las lipasas es su activación en presencia de interfaces hidrofóbicas. Las lipasas tienen la capacidad de presentar dos diferentes formas estructurales. Una de ellas se genera cuando el centro activo de la enzima se encuentra inaccesible al medio de reacción (en ausencia de interfase), debido a que es cubierto por una cadena polipeptídica llamada "lid" o tapadera, generando una estructura inactiva. La otra

forma estructural se presenta cuando la "lid" se encuentra desplazada y el centro activo se encuentra expuesto al medio de reacción (Brady *et al.*, 1990). En presencia de un medio hidrofóbico (interfase en un medio acuoso o en un medio orgánico), la "lid" se abre, debido a que la cara interna de esta tapadera y la zona circundante del sitio activo es muy hidrofóbica, permitiendo el libre acceso de los sustratos al sitio activo (activación interfacial) (Miled *et al.*, 2001; Verger, 1997). En un medio hidrofílico, la "lid" se mantiene cerrada, por lo cual en un medio acuoso existe un equilibrio desplazado hacia la forma cerrada.

2.5 Biocatalizadores utilizados en la producción de biodiesel

2.5.1 Lipasas extracelulares en síntesis de biodiesel

Respecto a la catálisis enzimática, se puede mencionar que es posible realizarla utilizando lipasas purificadas secretadas por los microorganismos al medio de cultivo (lipasas extracelulares) (Nelson *et al.*, 1996; Li *et al.*, 2006; Modi *et al.*, 2006) o usando directamente los microorganismos productores de lipasas intracelulares a modo de biocatalizadores (Zeng *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2007a; Li *et al.*, 2007b; Hama *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008b; Qin *et al.*, 2008), lo que disminuye los costos del biocatalizador pero se consiguen conversiones de alquil ésteres de ácidos grasos no mayores a 80% (Li *et al.*, 2007b; Li *et al.*, 2008b). Debido a que el presente estudio se enfoca en un método de inmovilización de lipasas, el presente apartado se centra en el uso de lipasas extracelulares que han sido purificadas y/o inmovilizadas para su aplicación en la producción de biodiesel.

A continuación se muestra la Tabla 2.2 con un resumen de las lipasas extracelulares comunmente utilizadas en la transesterificación de aceites o grasas para la obtención de biodiesel.

Tabla 2.2 Lipasas extracelulares aplicadas a la producción de biodiesel

Microorganismo productor	Alcohol usado	Uso co-solvente	Conversión (%)	Referencia
<i>Pseudomonas fluorescens</i> ^a	metanol	1,4-dioxano	>95	Iso <i>et al.</i> , 2001
<i>Escherichia coli</i> ^{a,d}	metanol	<i>n</i> -heptano	92	Luo <i>et al.</i> , 2006
<i>Rhizomucor miehei</i> ^a	metanol	hexano	95	Nelson <i>et al.</i> , 1996
<i>Candida antarctica</i> ^a / <i>Thermomyces lanuginosa</i> ^a	metanol	<i>tert</i> -butanol	95	Li <i>et al.</i> , 2006
<i>Thermomyces lanuginosa</i> ^a	metanol	-----	98	Xu <i>et al.</i> , 2004
<i>Burkholderia cepacia</i> ^a	etanol	-----	92	Kumari <i>et al.</i> , 2007
<i>Aspergillus oryzae</i> ^{a,e}	metanol	-----	90	Chen <i>et al.</i> , 2008
<i>Rhizopus oryzae</i> ^c	metanol	-----	80	Kaieda <i>et al.</i> , 1999
<i>Burkholderia cepacia</i> ^a	etanol	-----	72%	Abigor <i>et al.</i> , 2000
<i>Burkholderia fluorescens</i> ^a	etanol	-----	65%	Noureddini <i>et al.</i> , 2001
<i>Candida rugosa</i> ^b			30,8	
<i>B. cepacia</i> ^b	metanol	-----	32,6	Kaieda <i>et al.</i> , 2001
<i>B. fluorescens</i> ^b			29,4	

a: lipasas inmovilizadas

b: lipasa libre en solución acuosa

c: lipasa con 1(3)-regioespecificidad

d: lipasa de *B. fluorescens* clonada y expresada en *E. coli*

e: reacción en sistema bifásico aceite/agua

En definitiva y tomando en consideración los antecedentes presentados en esta sección, se ha decidido trabajar en una primera etapa con las lipasas provenientes de los siguientes microorganismos: *Rhizomucor miehei*, *Candida rugosa* (*cylindracea*), *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia fluorescens*, *Thermomyces lanuginosus* y *Rhizopus oryzae*.

2.5.2 Mecanismo de reacción

El mecanismo Ping-Pong Bi Bi con inhibición competitiva por alcohol es el modelo más aceptado para las reacciones de transesterificación y esterificación catalizadas por lipasas en medios no acuosos (Figura 2.4). Este efecto inhibitor puede ser explicado debido a que el alcohol formaría un complejo irreversible con la enzima, por lo que sólo parte de la enzima se encuentra disponible para realizar la catálisis de la reacción (Janssen *et al.*, 1996). Esto se suma a la baja solubilidad de alcoholes de cadena corta (menos de tres átomos de carbono) en medios orgánicos como son los triglicéridos. Lo anterior resulta en que el alcohol se concentra en las cercanías de la enzima, debido a su carácter hidrofílico, magnificando los efectos negativos producidos. Al respecto, es importante enfatizar que el carácter de inhibidor competitivo del metanol concuerda con el efecto negativo reportado en la mayoría de los estudios que investigan el uso de biocatalizadores en la producción de biodiesel (Chen y Wu, 2003; Shimada *et al.*, 1999).

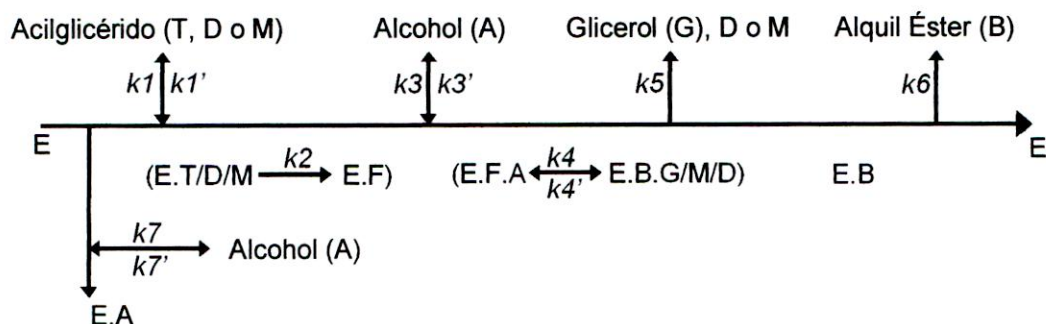


Figura 2.4 Mecanismo Ping-Pong Bi Bi para la reacción de transesterificación catalizada por lipasas (Al-Zuhair, 2006). E: lipasa, T: triglicérido, D: diglicérido, M: monoglicérido, E.A: Complejo lipasa-alcohol; E.T/D/M: Complejo formado por la lipasa y alguno de los acilglicéridos, E.F: Complejo lipasa-ácido graso libre, E.F.A: Complejo lipasa-ácido graso libre-alcohol, E.B.G/M/D: Complejo formado por la lipasa el alquil éster y glicerol, monoglicérido o diglicérido, E.B: Complejo lipasa-alquil ésteres (biodiesel).

Hasta ahora los mecanismos cinéticos de reacciones catalizadas por lipasas, se han basado en la hidrólisis de triglicéridos o la esterificación de ácidos grasos (Hermansyah *et al.*, 2006; Reyes y Hill, 1994; Xu *et al.*, 2005). Solamente se han encontrado un pequeño número de estudios cinéticos en la transesterificación de aceites con lipasas inmovilizadas (Cheirsilp *et al.*, 2007; A-Zuhair, 2005; Al-Zuhair *et al.*, 2007). En este proceso de dos etapas, los triglicéridos son primero hidrolizados para producir ácidos grasos libres, los que posteriormente son esterificados para producir nuevos ésteres (Al-Zuhair *et al.*, 2007).

En la Figura 2.5 se muestra el esquema del modelo de reacción propuesto para la reacción de transesterificación de triglicéridos catalizada por lipasas:

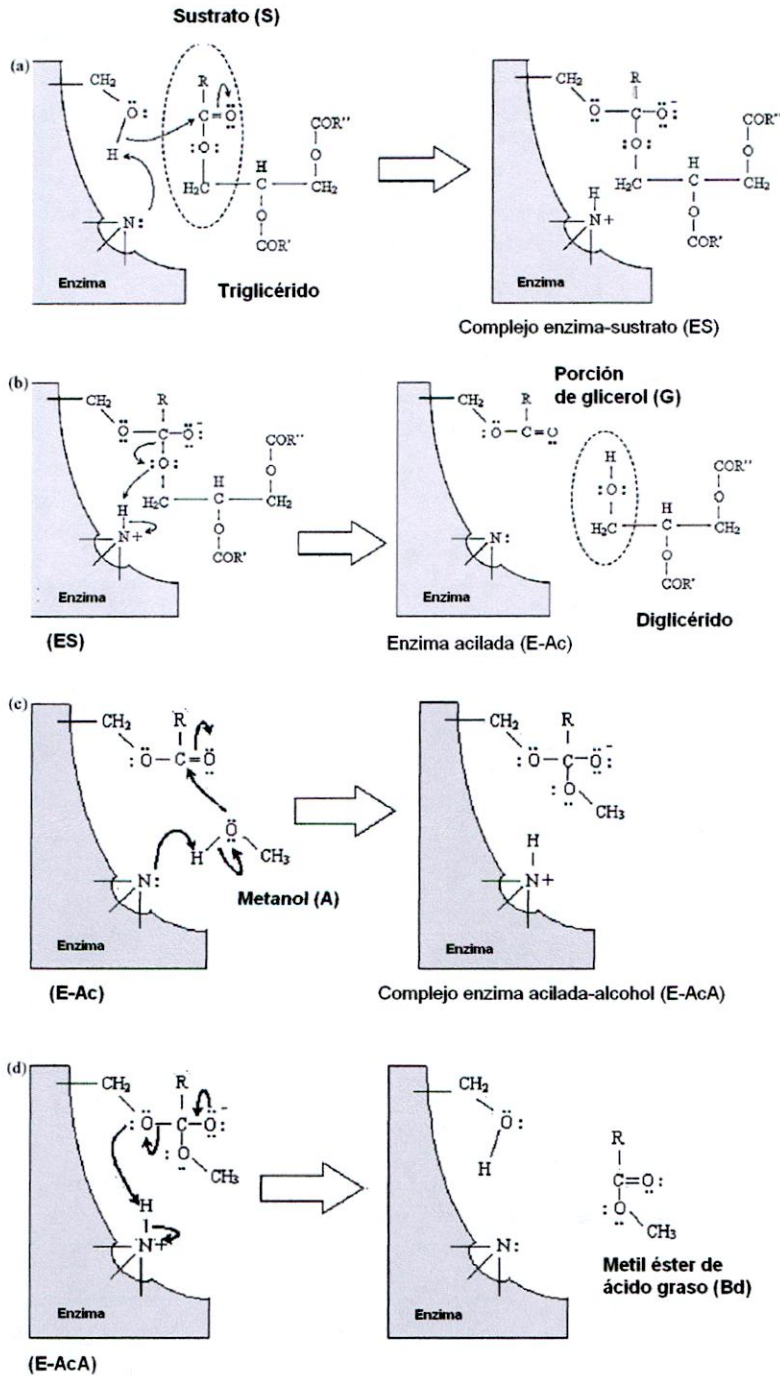


Figura 2.5 Mecanismo de producción enzimática de biodiesel a partir de triglicéridos (Al-Zuhair et al., 2007).

Como se puede apreciar en la Figura 2.5, los grupos funcionales ácidos y básicos encontrados en el sitio activo de la enzima, catalizan la reacción donando o aceptando protones durante el curso de la transesterificación. Los ácidos conjugados de aminas, por ejemplo, son dadores de protones, mientras que las aminas e iones carboxilatos son aceptores de protones. Transfiriendo protones hacia y desde estos grupos al sustrato, la enzima lleva a cabo la reacción dentro del sitio activo. Existen dos grupos funcionales que son parte del sitio activo y que han sido identificados como los grupos más importantes para el proceso catalítico. Uno es el grupo hidroxilo, que actúa como un nucleófilo, y el otro es el átomo de nitrógeno de un grupo amino, el cual acepta un protón para luego devolverlo durante la reacción. El mecanismo consiste en los siguientes cuatro pasos (Al-Zuhair *et al.*, 2007), los que se representan en la Figura 2.5:

- a) La adición nucleofílica para formar el complejo enzima sustrato, donde el nucleófilo es el oxígeno del grupo hidroxilo del sitio activo.
- b) La transferencia de un protón desde el ácido conjugado de la amina hacia un átomo de oxígeno del sustrato, formando una porción de la molécula de glicerol. Si el sustrato inicial es un triglicérido, entonces se formará un diglicérido, mientras que si es un diglicérido se formará un monoglicérido y finalmente si es un monoglicérido se formará glicerol.
- c) El átomo de oxígeno de una molécula de metanol se adiciona al átomo de carbono del C=O del intermediario acilo enzima para formar el complejo acilado enzima-alcohol.
- d) Finalmente, el átomo de oxígeno del complejo enzimático es eliminado y se transfiere un protón desde el conjugado ácido del grupo amino, obteniéndose una molécula de alquil éster de ácido graso (biodiesel).

2.5.3 Estrategias para el uso de biocatalizadores en la producción de biodiesel

Como se ha podido apreciar en los capítulos anteriores, no siempre se obtienen altos rendimientos de conversión de alquil ésteres de ácidos grasos al utilizar lipasas inmovilizadas como catalizadores de la reacción de transesterificación. Las principales causas de la pérdida de actividad y bajos rendimientos de conversión son el uso de metanol como aceptor de acilo y el depósito de glicerol en la superficie del biocatalizador (Drapcho *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2006; Iso *et al.*, 2001). A continuación se presentan algunas de las estrategias abordadas para aumentar el rendimiento de conversión:

Uso de alcoholes de mayor largo de cadena

Para evitar el problema de la pérdida de actividad del biocatalizador en presencia de alcoholes como metanol o etanol, se ha investigado el uso de alcoholes como 2-propanol (Modi *et al.*, 2006), *n*-butanol (Sakai *et al.*, 2010), 2-etil-1-hexanol (Linko *et al.*, 1998) y alcoholes alifáticos en el rango C4-C18:1 (De *et al.*, 1999). Si bien con alcoholes de cadena larga se obtiene la ventaja de alcanzar mayor rendimiento de conversión de alquil ésteres de ácidos grasos, la desventaja es que mientras mayor sea el largo de la cadena del alcohol, el producto se hace más propenso a cristalizar a mayores temperaturas, dificultando su uso en motores.

Reemplazo de alcoholes por alquil acetatos

Esta estrategia permite evitar el efecto negativo tanto del alcohol como del glicerol sobre la actividad de la enzima (Drapcho *et al.*, 2008). Como se mostró en el punto 2.3, las lipasas también son capaces de catalizar la reacción de interesterificación. Al cambiar el alcohol por metil acetato (Xu *et al.*, 2003; Du *et al.*, 2004) o etil acetato (Modi *et al.*, 2007), se producirán los metil ésteres de ácidos grasos y triacetilglicerol, el que queda integrado en el biodiesel final sin afectar las propiedades del biocombustible, lo que es muy conveniente debido a que

se ve aumentada la cantidad de biodiesel producido por cantidad de aceite en relación al proceso que utiliza metanol, viéndose favorecida además la recuperación de la lipasa. Sin embargo, la cantidad de enzima utilizada es de 30%p/p en relación al peso de aceite y la relación metil acetato:triglicéridos es de 12:1, mucho mayor que al usar metanol (entre 3 y 6:1) (Xu *et al.*, 2003), lo que aumentaría los costos de producción tomando en cuenta que el costo de metanol y etanol es aproximadamente 10 veces menor al costo de metil acetato.

Uso de co-solventes en el medio de reacción

Otra de las opciones para evitar los efectos negativos del metanol y el glicerol en la actividad del biocatalizador y el rendimiento de conversión de la reacción, es el uso de co-solventes como 1,4-dioxano (Iso *et al.*, 2001) y *tert*-butanol (Li *et al.*, 2006). El *tert*-butanol es un solvente orgánico relativamente hidrofílico por lo que el metanol y el glicerol son solubles en él, evitando los efectos negativos anteriormente nombrados. Al respecto, el uso combinado de Lipozyme TL IM y Novozym 435 en un sistema que contiene *tert*-butanol como co-solvente, entregó un rendimiento de conversión de metil ésteres de ácidos grasos de 95%p/p (Li *et al.*, 2006). Esta tecnología ha sido recientemente aplicada a la producción industrial de biodiesel en China con una capacidad de 20000 toneladas anuales, transformándose en la primera planta a escala industrial de producción de biodiesel catalizada por lipasas. En otras investigaciones se ha experimentado también con hexano como co-solvente, generando una conversión cercana a 80%p/p (Nelson *et al.*, 1996).

Por otro lado, se ha reportado la transesterificación de aceite de girasol con alcoholes como metanol, etanol y butanol en presencia y ausencia de éter de petróleo como co-solvente. Los rendimientos obtenidos usando etanol y butanol fueron altos incluso en ausencia de solvente, pero al usar metanol, se encontró que sólo se producían trazas de metil ésteres de ácidos grasos en ausencia de solvente (Mittelbach, 1990).

Otro enfoque relativo al medio de reacción se refiere al uso de líquidos iónicos en la producción de biodiesel catalizada por enzimas. Estos líquidos iónicos son sales orgánicas completamente compuestas de iones, destacándose como buenos sustitutos al uso de co-solventes orgánicos volátiles, tóxicos e inflamables. Al respecto, se ha estudiado una amplia

gama de líquidos iónicos, de los cuales el [Emim][Tfo] permitió alcanzar la mayor conversión de metil ésteres de ácidos grasos con un 80%p/p (Ha *et al.*, 2007).

Adición de metanol o etanol en pasos sucesivos

Cuando se realizan reacciones conteniendo más de 1,5 equivalentes molares de metanol respecto al aceite, el metanol permanece como gotas dispersas, inactivando a las moléculas de lipasas cercanas a las gotas de metanol. Por ello, la metodología operacional de agregar en varios pasos el metanol a la mezcla de reacción para no superar este valor, se presenta como una buena solución para mantener el metanol completamente disuelto en la mezcla (Shimada *et al.*, 2002).

En algunos estudios se han abocado a mejorar la eficiencia del proceso usando metanol como aceptor de acilo y sin el uso de co-solventes (Shimada *et al.*, 1999). En este estudio se aplicó la adición de metanol por pasos sucesivos para evitar la inactivación y/o inhibición de la lipasa y lograr mayores rendimientos de conversión. Así, se obtuvo una conversión cercana a 95%p/p. Debido a los altos rendimientos de conversión obtenidos, se ha realizado un gran número de trabajos en los que se aplica esta estrategia (Nelson *et al.*, 1996).

Pretratamiento del biocatalizador

Por otro lado, se ha propuesto el pretratamiento de enzimas inmovilizadas incubándolas en metil oleato y subsecuentemente en aceite de soya. Esta estrategia disminuyó los efectos inhibitorios del metanol, alcanzando altas conversiones de metil ésteres de ácidos grasos (Samukawa *et al.*, 2000).

Reactivación del biocatalizador

Otros autores se han enfocado en la reactivación de biocatalizadores que han estado en presencia de metanol. Al respecto se ha estudiado el uso de *tert*-butanol y 2-butanol para reactivar la enzima mediante lavados. Los resultados muestran que luego de una inactivación y/o inhibición casi total de la enzima, se logró recuperar el 56% de la actividad con 2-butanol y el 75% de la actividad con *tert*-butanol (Cheng y Wu, 2003).

Irradiación ultrasónica para emulsificación

La irradiación ultrasónica de baja frecuencia es una herramienta útil para la emulsificación de líquidos inmiscibles. Al respecto se han realizado investigaciones (Wang *et al.*, 2007) que han intentado aplicar la irradiación ultrasónica (la cual es usada exitosamente en el proceso de transesterificación empleando un catalizador químico) en la reacción catalizada por lipasas. El trabajo citado anteriormente utilizó la lipasa Novozym 435 para catalizar la reacción de transesterificación de aceite residual (alto índice de acidez) y 1-propanol bajo condiciones asistidas por ultrasonido, obteniendo finalmente una conversión de 94,9%p/p de propil oleato.

2.5.4 Limitaciones de transferencia de masa interna y externa

La inmovilización enzimática posee ventajas como el aumento de la estabilidad térmica y el fácil manejo y recuperación del biocatalizador. Sin embargo, también tiene desventajas. Debido al gran tamaño molecular de los triglicéridos y alquil ésteres de ácidos grasos, se dificulta su difusión a través de los pequeños poros de los soportes para alcanzar el lugar donde ha quedado inmovilizada la enzima, mientras que el reactante que se encuentra parcialmente soluble en el medio de reacción (alcohol) debe viajar a través del aceite que llena los canales del soporte. Mientras mayor sea el tamaño de partícula, es más probable que se presenten limitaciones de transporte interno, generando una disminución en la

eficiencia de la enzima. Igualmente, las limitaciones de transferencia de masa externa podrían surgir, debido a la formación de una película alrededor del soporte, efecto que puede ser paliado aumentando la agitación en reactores batch y reactores continuos de tanque agitado o incrementando el flujo en reactores de lecho empacado (Fjerbaek *et al.*, 2009).

En el caso de la producción de biodiesel, un subproducto como el glicerol podría formar la película de carácter hidrofílica en la superficie del biocatalizador, impidiendo el contacto del sustrato hidrofóbico (acilgliceroles) con la enzima. Al respecto, se ha reportado que el glicerol disminuye la actividad de la enzima inmovilizada, debido más probablemente a las limitaciones de transferencia de masa que a una inhibición enzimática en estricto rigor (Belafibako *et al.*, 2002; Dossat *et al.*, 1999).

2.5.5 Inmovilización de lipasas en producción de biodiesel

Se entiende por enzima inmovilizada aquella química o físicamente asociada a (o contenida en) un soporte o matriz que no es esencial para su actividad. Esta definición no supone que el soporte deba ser un sólido insoluble, ni que la enzima no se encuentre en solución dentro del sistema que la contiene (Illanes, 1994). Lo anterior es válido en la mayoría de los métodos clásicos de inmovilización que utilizan soportes, como por ejemplo, la adsorción física dentro de un soporte sólido, el enlace covalente a un soporte sólido y atrampamiento físico dentro de un soporte de matriz polimérica. Sin embargo, en el caso del presente estudio, la definición de enzima inmovilizada no contempla el uso de soportes (ver punto 2.5).

Independiente de la definición de "inmovilización enzimática" o del método utilizado para lograrla, ésta técnica representa una forma de eliminar alguna de las "desventajas" inherentes a las enzimas, o mejor dicho, cualidades que no son convenientes al usar biocatalizadores en procesos industriales. Algunas de estas características son la dificultad de recuperación desde el medio de reacción y la pérdida de actividad catalítica bajo condiciones operacionales (alta temperatura, pH extremo, presencia de solventes orgánicos) (Gerhartz, 1990).

Respecto a las lipasas, las interacciones lipofílicas de las partes hidrofóbicas de esta enzima con el sustrato o solvente orgánico, podrían dejar a la enzima retenida en el soporte en una conformación más activa (Bastida *et al.*, 1998). En solución tampón, por ejemplo, los aminoácidos más hidrofílicos de la lipasa son expuestos al medio de acoplamiento y la enzima tiende a plegarse. Sin embargo, en un medio de baja polaridad como por ejemplo el heptano ($\log P = 4,0$) los dominios lipofílicos de la lipasa podrían interactuar con dicho solvente orgánico. Este último efecto parece ayudar a inducir cambios conformacionales de la lipasa, resultando en una forma más activa, lo que permitiría el fácil acceso del sustrato al sitio activo de la lipasa inmovilizada y aumentaría la actividad de ésta a través del "mecanismo de activación interfacial" (Palomo *et al.*, 2002). Como prueba de lo anterior, los estudios muestran que el rendimiento de alquil ésteres solo alcanzó un 20% en 4 h de reacción empleando como biocatalizador una lipasa previamente inmovilizada en presencia de la solución tampón, en cambio, la conversión llegó a un 70% usando heptano como medio de unión al soporte.

Como se muestra en la Tabla 2.3, los biocatalizadores usados en la producción de biodiesel han sido inmovilizados en una variada gama de soportes.

Tabla 2.3 Soportes utilizados en la inmovilización de lipasas para la producción de biodiesel

Soporte	Tipo de unión	Microorganismo productor de lipasa	Referencia
Zeolita	Adsorción	<i>T. lanuginosa</i>	Yagiz <i>et al.</i> , 2007
Hidrotalcita			
Sílica aerogel	Encapsulación	<i>C. antarctica</i>	Ocaire <i>et al.</i> , 2006
		<i>B. cepacia</i>	
Kaolinita	Adsorción	<i>B. fluorescens</i>	Iso <i>et al.</i> , 2001
Resina apolar macroporosa	Adsorción hidrofóbica	<i>Candida sp.</i> 99-125	Yang <i>et al.</i> , 2006
Matriz sol-gel de fosilicato	Encapsulación	<i>B. cepacia</i>	Hsu <i>et al.</i> , 2004
		<i>T. lanuginosa</i>	
Celita	Adsorción	<i>C. viscosum</i>	Shah <i>et al.</i> , 2004
Accurel MP1004 (macroporos de polipropileno)	Adsorción hidrofóbica	<i>C. Antarctica</i>	Salis <i>et al.</i> , 2005
		<i>R. miehei</i>	
		<i>B. cepacia</i>	
Nanopartículas magnéticas de polivinil acetato-divinilbenceno	Adsorción hidrofóbica	<i>C. cylindracea</i>	Guo <i>et al.</i> , 2003
Resina macroporosa de polipropileno (Novozym 435)	Adsorción hidrofóbica	<i>C. antarctica</i>	Chang <i>et al.</i> , 2005

Si bien, el uso de soportes mejora en algunos casos tanto la estabilidad como la actividad de la lipasa inmovilizada, además de incrementar el rendimiento de conversión de alquil ésteres de ácidos grasos en la reacción de transesterificación, el costo del biocatalizador

inmovilizado es elevado debido al uso del soporte, el cual representa más del 90% de la masa del biocatalizador. Por este motivo el presente estudio plantea el uso de CLEAs de lipasa, metodología de inmovilización que no requiere del uso de soporte (ver secciones 2.5 y 2.6).

2.6 Inmovilización de enzimas sin uso de soporte

El mejoramiento de los biocatalizadores en cuanto a su estabilidad y actividad puede ser logrado a menudo mediante los métodos convencionales de inmovilización con uso de soportes (Clark, 1994; Cabral y Kennedy, 1993; Rocchietti *et al.*, 2002). Sin embargo, el uso de un soporte provoca la dilución de la actividad de las enzimas inmovilizadas, debido principalmente a la introducción de una gran fracción de masa no catalítica que va entre 90 y 99,9%. Inevitablemente, esto desemboca en la obtención de bajas productividades (Tischer y Kasche, 1999). Así, los métodos de inmovilización que requieren el uso de soporte, entregan rendimientos de inmovilización cercanos al 50% de la actividad inicial (Bryjak y Kolarz, 1998), especialmente a altas cargas enzimáticas (Janssen *et al.*, 2002). Según lo anterior, se han realizado avances en materia de enzimas inmovilizadas sin uso de soporte (Cao *et al.* 2003), comenzando con los CLEs (enzimas entrecruzadas) (Habeeb, 1967; Jansen y Olson, 1969), para posteriormente generar el desarrollo de los CLECs (cristales enzimáticos entrecruzados) (Leothanacharion *et al.*, 2008; Noritomi *et al.*, 2007; Roy y Abraham, 2006; Gogoi *et al.*, 2006), y los CLEAs (agregados enzimáticos entrecruzados) (Cao *et al.*, 2000).

2.6.1 CLE

El desarrollo del entrecruzamiento de enzimas se presentó inicialmente como una estrategia para el aumento de la estabilidad térmica de estos biocatalizadores. Sin embargo, el entrecruzamiento requiere de un delicado balance entre varios factores, como la cantidad de agente de entrecruzamiento, temperatura, pH y fuerza iónica. Al respecto, el

entrecruzamiento intermolecular de enzimas altamente solvatadas a menudo tiene varias desventajas, como la baja retención de actividad, baja reproducibilidad y baja estabilidad mecánica. Además se han encontrado dificultades para la manipulación de los CLE debido a que son de consistencia gelatinosa y es difícil de controlar los parámetros geométricos de las enzimas entrecruzadas en forma aleatoria (Cao *et al.*, 2003).

2.6.2 CLEC

Se han producido CLECs de enzimas como subtilisina (Noritomi *et al.*, 2007), alcohol dehidrogenasa (Lee *et al.*, 1986), lacasa (Roy y Abraham, 2006), organofosfato hidrolasa (Leothanacharion *et al.*, 2008) y lipasa (Gogoi *et al.*, 2006). Los CLECs muestran un aumento de la estabilidad térmica y mecánica respecto a los CLEs (Quiocho y Richards, 1966). Tienen un amplio rango de estabilidad a distintos pH (Tüchsen y Ottesen, 1977) y muestran un aumento de la estabilidad en presencia de solventes orgánicos (Lee *et al.*, 1986). Sin embargo, la cristalización es una metodología que implica un alto costo debido a que para obtener los cristales se debe tener la enzima altamente purificada y además es crucial minimizar el tamaño de los cristales para poder retener una alta actividad en el biocatalizador (Quiocho y Richards, 1966).

2.6.3 CLEA

Al Cambiar las propiedades que afectan la proximidad de las moléculas enzimáticas solubles, se pueden formar agregados físicos (enzima precipitada) los que luego de ser entrecruzados formarían CLEAs. Por ejemplo, es posible formar agregados cambiando el estado de hidratación de la enzima, alterando la constante electrostática de la solución al agregar agentes precipitantes adecuados tales como los empleados en la purificación de proteínas (Rothstein, 1994). Bajo estas condiciones, las moléculas de enzima altamente solvatadas se asociarían hasta el punto en el que precipitan como agregados insolubles. Análogo a los CLECs, estos agregados insolubles pueden ser entrecruzados por la adición

de un entrecruzante bifuncional. El CLEA formado muestra de esta forma actividades y estabilidades comparables a los CLECs (Cao *et al.*, 2001).

Comparado con otros métodos de inmovilización enzimática sin uso de soportes, el uso de CLEAs es aún una tecnología emergente y en desarrollo, por lo que aún quedan por explorar aspectos críticos, como por ejemplo, cómo controlar el tamaño de las partículas sin provocar problemas de carácter difusional, cómo hacer que la conformación de la enzima sea flexible, y cómo modular la actividad enzimática y selectividad alterando las condiciones de agregación. Actualmente la atención se ha dirigido a la elaboración de CLEAs de un amplio rango de enzimas, nuevos métodos de agregación y nuevos agentes de entrecruzamiento.

Con el fin de esquematizar la metodología de elaboración de CLEAs, a continuación se muestra la Figura 2.6.

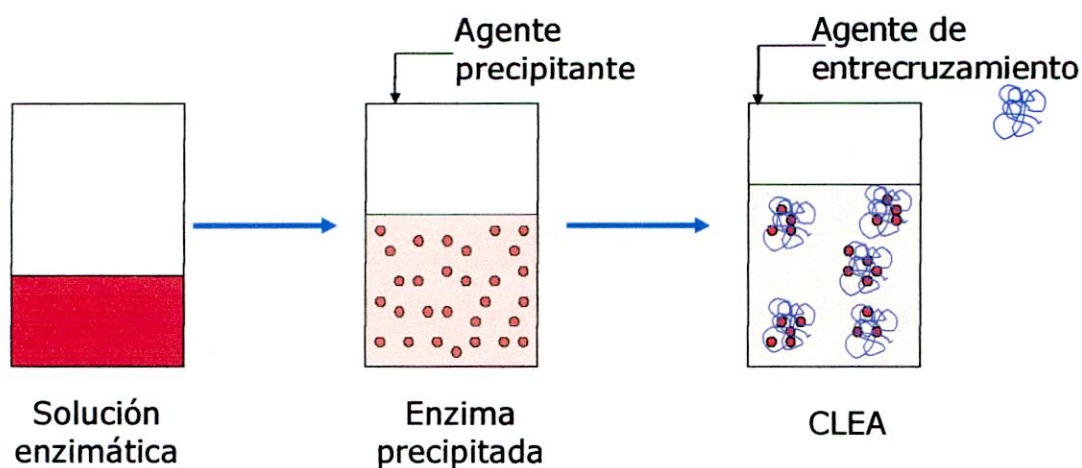


Figura 2.6 Esquema de la preparación de CLEAs considerando las principales etapas del proceso, como son la precipitación y el entrecruzamiento.

Precipitación

La precipitación inducida por la adición de sales, solventes orgánicos y polímeros no iónicos o ácidos (Hofland *et al.*, 2000) a soluciones acuosas de proteínas es un método comúnmente usado para la purificación de proteínas. Estos agregados físicos son

estructuras supramoleculares unidas mediante enlaces no covalentes, los que se disuelven al resuspenderlos en agua.

La precipitación mediante la adición de sales obedece al fenómeno de salting out, donde al aumentar la concentración de sales en la solución enzimática, se aumenta la fuerza iónica, produciendo la disminución de la solubilidad de las proteínas. Respecto al uso de solventes orgánicos como agentes precipitantes, éstos reducen la solubilidad de las proteínas mediante la disminución de la constante dieléctrica de la solución acuosa y disminuyen el agua libre a los alrededores de la superficie de las proteínas. Por otra parte, la precipitación mediante el uso de polímeros no iónicos funciona disminuyendo el agua libre alrededor de la superficie de las proteínas, uniéndose a los polímeros vía puentes de hidrógeno haciendo precipitar al complejo (Hirose, 2002). Según lo anterior, la precipitación se lleva a cabo mediante diferentes mecanismos, por lo que se contemplará la utilización de una sal como el sulfato de amonio, dos solventes orgánicos como son el *tert*-butanol y la acetona y un polímero no iónico como el polietilenglicol 600, los que se han utilizado anteriormente en los trabajos realizados con diferentes enzimas para la preparación de CLEAs (Cao *et al.*, 2001; Wilson *et al.*, 2006; Kumari *et al.*, 2007).

Entrecruzamiento

Luego de la precipitación de la enzima, se procede al entrecruzamiento de este agregado enzimático mediante agentes de entrecruzamiento, generalmente del tipo homobifuncionales (contienen dos grupos reactivos funcionales idénticos) para inducir el entrecruzamiento intramolecular (entre dos sitios de una macromolécula) e intermolecular (entre dos macromoléculas). El entrecruzamiento intramolecular ha sido usado para aumentar la estabilidad de proteínas ante la inactivación térmica y mecánica, determinando la distancia entre los dos grupos reactivos y detectando diferentes estados conformacionales. El entrecruzamiento intermolecular (de especial interés para el presente método de inmovilización) se ha usado para caracterizar la naturaleza y extensión de interacciones entre proteínas. Dentro de los agentes de entrecruzamiento homobifuncionales se encuentran los dialdehídos, siendo de éstos el glutaraldehído uno de los más utilizados para el entrecruzamiento de proteínas (Wong, 1993). Por otra parte, la longitud del glutaraldehído (molécula con cinco átomos de carbono) posibilitaría el entrecruzamiento intra e intermolecular, sin embargo, los polímeros de glutaraldehído y la concentración de la

solución de glutaraldehído promueven la formación de un entrecruzamiento intermolecular debido al aumento de tamaño de la molécula de entrecruzante (Cheung y Nimni, 1982). En el caso de la síntesis de CLEA, el entrecruzamiento intermolecular permite que los agregados enzimáticos se agrupen en unidades de mayor tamaño, permitiendo una mejor recuperación del biocatalizador, logrando además la estabilización del biocatalizador.

Además, existen polímeros polifuncionales de alto peso molecular como el dextrano aldehído (100 a 200kDa), que contienen numerosos grupos aldehídos reactivos conocidos por ser entrecruzantes efectivos para proteínas o subunidades. El uso del dextrano aldehído se ha probado en un estudio que utiliza CLEAs de nitrilasa (Mateo *et al.*, 2004), los que presentan una retención de actividad baja o inexistente debido al uso de glutaraldehído como agente de entrecruzamiento. Una posible explicación es que la reacción de entrecruzamiento se da entre el glutaraldehído y algún residuo de lisina cercano al sitio activo, bloqueando o dificultando la entrada del sustrato; si esto es así, entonces el glutaraldehído es particularmente inactivante debido a su alta reactividad y pequeño tamaño, lo que permite que penetre en la estructura interna de la proteína. Por ello la solución que han planteado Mateo y colaboradores (Mateo *et al.*, 2004) es tener un agente entrecruzante que no tenga acceso a la estructura interna de la enzima, para lo cual se trabajó con un polialdehído como el dextrano aldehído, lo que solucionó en cierta medida el problema al obtener un CLEA capaz de retener mayor actividad en el caso de nitrilasas. En la Figura 2.7 se muestra la molécula de dextrano, la que es oxidada para obtener el dextrano aldehído con el cuál se entrecruzarán las lipasas.

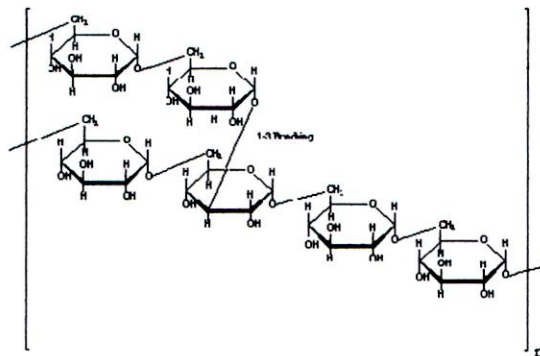


Figura 2.7 Molécula de dextrano

Por otro lado, el glutaraldehído forma polímeros en solución. A pH ácido, los polímeros son hemiacetales cíclicos. A pH neutro o ligeramente alcalino, se forman polímeros de glutaraldehído α,β -insaturados, los cuales aumentan ampliamente a medida que el pH aumenta. Presumiblemente estos son los polímeros insaturados que se entrecruzan con los grupos amino de las proteínas (Wong, 1993). Por tal razón, una de las variables a estudiar en la producción de CLEA es el tipo y tamaño del agente de entrecruzamiento, considerando el uso de glutaraldehído, polímeros de glutaraldehído y dextrano polialdehído, determinando si ésta variable presenta algún efecto en la actividad, retención de actividad o el tamaño de partícula del CLEA. En la Figura 2.8 se muestran los pasos de la reacción de polimerización de glutaraldehído y el entrecruzamiento entre los grupos aldehído con los grupos amino de las proteínas.

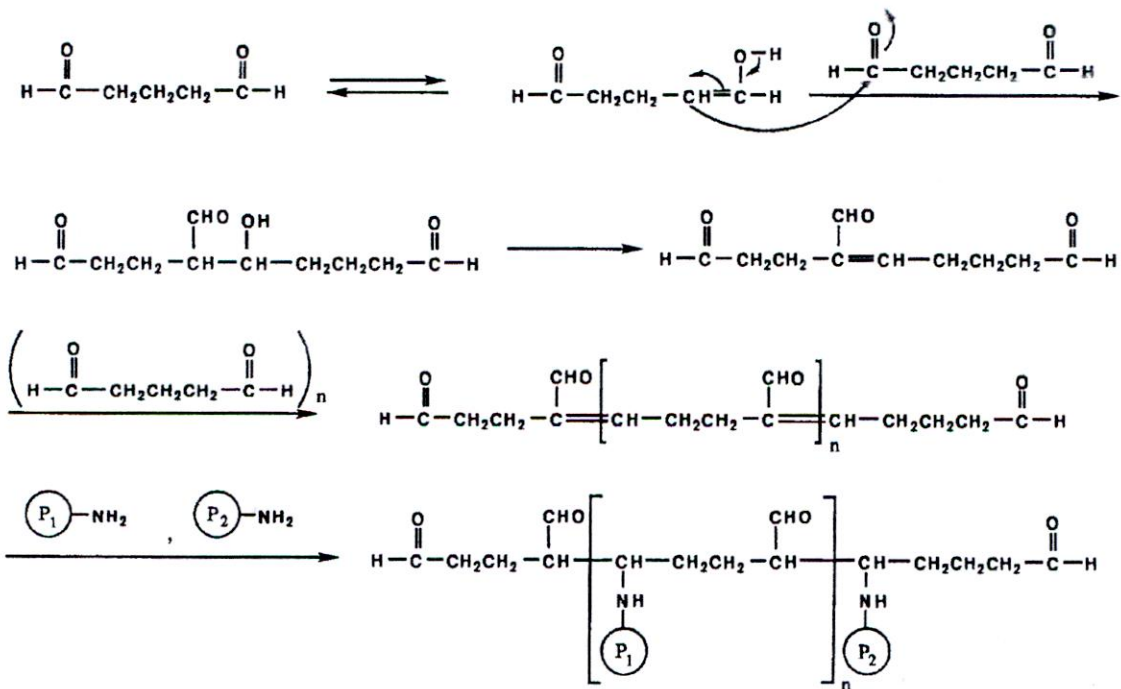


Figura 2.8 Polimerización de glutaraldehído y entrecruzamiento con proteínas. P_1 y P_2 representan proteínas (Wong, 1993).

Estudio con CLEAs de distintas enzimas

En algunos estudios se ha tratado la optimización de la producción de CLEAs de una variedad de enzimas, lo que implica la selección del precipitante y su concentración así como la concentración de proteína y del agente de entrecruzamiento.

En la Tabla 2.4 se muestran las enzimas que han sido inmovilizadas mediante la preparación de CLEAs.

Tabla 2.4 Preparación de CLEAs de distintas enzima

Enzima	Referencia
Hidrolasas	
Nitrilohidratasas	
Oxinitrilasas	Sheldon, 2007
Lacasas	
Catalasas	
Galactosa oxidasas	
Oxidasas	Schoevaart <i>et al.</i> , 2004
Lacasas	Cabana <i>et al.</i> , 2007
Tirosina	Aytar y Bakir, 2008
Penicilina acilasa	Illanes <i>et al.</i> , 2007

Esta tecnología es también aplicable a la preparación de combi-CLEAs, los que contienen dos o más enzimas para usar por ejemplo en una síntesis en la que se consideran varias reacciones, como por ejemplo un combi-CLEA oxinitrilasa/nitrilasa para la conversión de benzaldehído en (S)-ácido mandélico con un alto rendimiento y pureza enantiomérica (Sheldon, 2007).

2.7 CLEAs de lipasa

Se ha reportado la elaboración de CLEAs de variadas lipasas (Schoevaart *et al.*, 2004; López-Serrano *et al.*, 2002; Shah *et al.*, 2006), pero aún existen problemas que deben ser solucionados.

El entrecruzamiento para la formación de CLEAs se realiza entre un grupo aldehído (proveniente generalmente del agente de entrecruzamiento) y un grupo amino (proveniente generalmente de los residuos de lisina presentes en la superficie de la enzima). Sabiendo además que las lipasas poseen una baja cantidad de residuos de lisina en su superficie, se presenta la problemática de que al intentar producir CLEAs de lipasa, el entrecruzamiento es deficiente. Para solucionar este obstáculo, se ha investigado, por ejemplo, la adición de albúmina de suero bovino (BSA) (la que presenta diez veces más residuos de lisina que la mayoría de las lipasas) para facilitar la formación de CLEAs de lipasa PS de *B. cepacia* (Shah *et al.*, 2006). La desventaja de este enfoque es la dilución de la enzima con una proteína que no aporta actividad, sin embargo permite retener la actividad en el biocatalizador, permitiendo su reutilización. La optimización de la cantidad de BSA agregada a la preparación de CLEAs de lipasa ha sido estudiada considerando al glutaraldehído como agente de entrecruzamiento. Por lo tanto, en el presente estudio se propone determinar la cantidad de BSA adicionada a la preparación de CLEAs debido a que se utilizarán agentes de entrecruzamiento de mayor peso molecular como polímeros de glutaraldehído y dextrano aldehído, lo que podrían promover la formación de CLEAs con distintas características estructurales.

Se han elaborado CLEAs a partir de preparados comerciales de lipasas de *Alcaligenes* sp. (QL) y *Candida antarctica (fraction B)* (CAL-B), observándose la pérdida de enzima desde el CLEA mediante electroforesis SDS-PAGE, indicando que la enzima no permanece apropiadamente entrecruzada. La solución planteada ha sido la co-precipitación de lipasas con polietilenimina (PEI) o mezclas de PEI con dextrano sulfato (PEI-DS), permitiendo obtener CLEAs físicamente estables y con alta estabilidad en presencia de solventes orgánicos al agregar un polímero con grupos amino. La naturaleza de estos polímeros permite alterar significativamente la actividad, enantioselectividad y especificidad de las lipasas tomando en cuenta la actividad de hidrólisis de (+/-)-glicidilbutirato (Wilson *et al.*,

2006). Si bien se logra un mejor entrecruzamiento, el microambiente formado por la adición de PEI o PEI-DS es de carácter hidrofílico, lo que no sería una buena estrategia al pensar en una reacción en medio orgánico en la que se desea evitar el contacto del biocatalizador con compuestos hidrofílicos como el glicerol generado como subproducto de la transesterificación y el metanol o etanol usados como sustratos.

Otros investigadores han llevado a cabo la elaboración de combi-CLEAs con extracto crudo en polvo de una mezcla de lipasas, amilasas y fosfolipasas (Dalal *et al.*, 2007). Cabe destacar que en este enfoque se visualiza la posible utilización del combi-CLEA en distintas reacciones, pero considerando la mejora del entrecruzamiento de la lipasa al co-inmovilizarla con otras enzimas que contengan mayor número de residuos de lisina.

Respecto a la aplicación de CLEAs de lipasa en la producción de biodiesel, existe un estudio previo tomando en cuenta la reacción de transesterificación de aceite de *Madhuca indica* con un contenido de ácidos grasos libres de 21%p/p (Kumari *et al.*, 2007). Se debe destacar que el estudio citado no evalúa la actividad específica de transesterificación del biocatalizador y al evaluar el rendimiento de conversión, se llega a valores no superiores a 92%p/p según una metodología de cuantificación de alquil ésteres de ácidos grasos que podría estar tomando en cuenta los ácidos grasos libres, lo que se respalda debido a que estos resultados no pudieron ser reproducidos para aceites de bajo contenido de ácidos grasos libres (rendimiento de conversión de 74%p/p aproximadamente), por lo que el rendimiento de conversión de alquil ésteres de ácidos grasos se presenta como un buen objeto de optimización y estudio usando CLEAs de lipasa como catalizador de la reacción de transesterificación.

Por otra parte, al considerar que se trabajará en un medio orgánico en el cual se desea evitar el contacto tanto con el alcohol como con el glicerol, se presentarán dos enfoques que puedan cumplir con dichos requerimientos. El primer enfoque es el uso de un CLEA de lipasa y adicionalmente una superficie hidrofílica no catalítica en el medio de reacción (sílica gel). Ésta superficie podría adsorber los compuestos hidrofílicos y evitar el contacto con el biocatalizador, pudiendo alcanzar mayores rendimientos de conversión. Por otra parte, el segundo enfoque implica la elaboración de un CLEA con superficie hidrofóbica, mediante el uso de alcoxisilanos (Panov y Terziev, 2009), evitando también el contacto con los compuestos hidrofílicos que merman la actividad y rendimiento de conversión. Específicamente, se intentará aplicar algunas técnicas de elaboración de CLEAs con

superficie hidrofóbica mencionadas en la postulación de patente perteneciente a la empresa CLEA Technologies (Schoevaart *et al.*, 2008). En dicho documento se enuncia la elaboración de CLEA generando grupos aldehído en la superficie de la enzima para luego entrecruzar el agregado enzimático con compuestos que contengan grupos amino, lo que evitaría el uso de BSA para mejorar el entrecruzamiento. Además se menciona la factibilidad de regular el tamaño e hidrofobicidad de los CLEA mediante el uso de distintos alcoxisilanos.

3 Materiales y Métodos

3.1 Materiales

En la Tabla 3.1 se indican las lipasas comerciales así como su nomenclatura, proveedor y país de procedencia.

Tabla 3.1 Lipasas comerciales en formato sólido sin inmovilizar utilizadas en el estudio

Lipasa	Nomenclatura	Proveedor	País
Lipasa PS (<i>B. cepacia</i>)	PS	Amano Enzyme	Estados Unidos
Lipasa SL (<i>B. cepacia</i>)	SL	Meito Sangyo	Japón
Lipolyve R (<i>R. oryzae</i>)	R	Lyven	Francia
Lipasa AYS (<i>C. rugosa</i>)	AYS	Amano Enzyme	Estados Unidos
Lipasa AK (<i>B. fluorescens</i>)	AK	Amano Enzyme	Estados Unidos
Lipasa L768P (mezcla lipasa hongos)	L768P	Biocatalysts	Inglaterra
Lipasa L691P (<i>Candida sp./Rhizopus sp.</i>)	L691P	Biocatalysts	Inglaterra
Lipasa L166P (<i>M. javanicus</i>)	L166P	Biocatalysts	Inglaterra
Lipasa 34P (<i>C. rugosa</i>)	L34P	Biocatalysts	Inglaterra

Cabe indicar que según los proveedores, todas las lipasas mostradas en la tabla 3.1 poseen una temperatura óptima entre 40°C y 55°C; no obstante, las lipasas PS, SL y AK presentan mayor estabilidad térmica. Respecto al pH, todas muestran un rango de pH óptimo entre 5 y 8; sin embargo, las lipasas PS, SL y AK son estables dentro de un amplio rango de pH comprendido entre 3 y 11.

A continuación, en la Tabla 3.2, se presentan los principales compuestos y reactivos utilizados.

Tabla 3.2 Principales compuestos utilizados para llevar a cabo las experiencias

Compuesto	Nomenclatura	Marca	Función/Metodología	País
<i>p</i> -nitrofenilbutirato	p-NPB	Sigma	Actividad hidrólisis	USA
<i>p</i> -nitrofenolpalmitato	p-NPP	Sigma	Actividad síntesis	USA
Tricaprina	TC	Sigma	Cuantificación acilglicéridos	USA
Trioleina	TG	Sigma	Curva calibrado acilglicéridos	USA
Dioleina	DG	Sigma	Curva calibrado acilglicéridos	USA
Monooleina	MG	Sigma	Curva calibrado acilglicéridos	USA
N,O-Bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida	BTMSTFA	Alfa Aesar	Derivatización de muestras para cuantificación de acilglicéridos	Singapur
Acetona	AC	Vimaroni	Precipitante	Chile
<i>tert</i> -butanol	TB	Merck	Precipitante	Alemania
Sulfato de amonio	AS	Merck	Precipitante	Alemania
Polietilenglicol 600	PG600	Merck	Precipitante	Alemania
Tritón X-100	TX-100	Sigma	Preparación CLEA	USA
Glutaraldehído 25%v/v	G	Sigma	Entrecruzante	USA
Dextrano	D	Sigma	Entrecruzante	USA
Albúmina de suero bovino	BSA	Merck	Preparación CLEA	Alemania
<i>m</i> -xililenediamina	MXDA	Sigma	Entrecruzante	USA
hexametilenediamina	HMDA	Sigma	Entrecruzante	USA
1,3-diamino-2- hidroxipropano	DAHP	Sigma	Entrecruzante	USA
trimetoxipropilsilano	TMPS	Sigma	Hidrofobización CLEA	USA
tetraetoxisilano	TES	Sigma	Hidrofobización CLEA	USA
propiltrietoxisilano	PTES	Sigma	Hidrofobización CLEA	USA
trimetoximetilsilano	TMMS	Sigma	Hidrofobización CLEA	USA
Metanol	M	Loba Chemie	Sustrato para transesterificación	India
Etol 96%	E	Vimaroni	Sustrato para transesterificación	Chile

(continuación Tabla 3.2)

Compuesto	Nomenclatura	Marca	Función/ Metodología	País
Kit BCA	BCA	Thermo	Cuantificación de proteínas	USA
Heptano	----	Mallinckrodt	Cuentificación acilglucéridos	México
Hexano anhidro	----	Sigma	Actividad síntesis	USA
Sílica gel 60	----	Utech	Superficie hidrofílica en reacción de transesterificación	USA
Aceite raps/canola	----	Mazzola	Sustrato para transesterificación	Chile

En la Tabla 3.3 se muestran los equipos utilizados en el transcurso del proyecto y la descripción del uso que se les dio respecto a la obtención de datos.

Tabla 3.3 Equipos utilizados para el desarrollo de la tesis

Equipo	Marca	Modelo	Uso
Espectrofotómetro	Jenway	6715 UV/Vis	Medición actividad de hidrólisis, transesterificación y concentración de proteína.
Cromatógrafo de gases	Perkin Elmer	Clarus 500	Cuantificación de mono, di y triglicéridos
Microscopio óptico	Nikon	Eclipse 50i	Obtención imágenes para análisis de tamaño de partícula
Termocirculador	Lab Tech	LCB-22H	Fijar temperatura en baño de agua
Centrifuga capachos y eppendorf	Capachos: Sorvall Eppendorf: Heraeus	Capachos: RC-5B Eppendorf: Biofuge15	Separación de fase líquida y sólida

3.2 Metodología analítica

3.2.1 Determinación de actividad de síntesis

Esta determinación tiene como objetivo caracterizar las lipasas comerciales en base a la reacción de transesterificación, que es la reacción que lleva a cabo en la producción de biodiesel. El método está basado en la reacción de transesterificación catalizada por lipasas entre para-nitrofenilpalmitato (pNPP) y etanol (Teng y Xu, 2007). El ácido palmítico contenido en el pNPP posee dieciséis átomos de carbono, asemejándose más al largo de cadena de los ácidos grasos presentes en los triglicéridos de los aceites usados para la producción de biodiesel. El para-nitrofenol (pNP) que es liberado como producto de la transesterificación es detectado mediante un método espectrofotométrico y es usado como el indicador para la determinación de la actividad de síntesis de las lipasas. La transesterificación es llevada a cabo en hexano anhidro, sistema usado como modelo de reacción para evitar la reacción de hidrólisis.

El protocolo de medición de la actividad de síntesis comprende lo siguiente:

- Pesar lipasa comercial o biocatalizador inmovilizado (entre 1 y 20 mg).
- Mezclar con 1mL de solución 30mM de pNPP en hexano anhidro.
- Dejar a 40°C durante 2 minutos.
- Para empezar la reacción se agregan 60µL de etanol a la mezcla de reacción manteniendo una agitación de 200rpm.
- Tomar muestras de 25µL de sobrenadante a distintos tiempos de reacción (entre 0 y 6minutos), agregándola inmediatamente a una celda que contiene previamente 1 mL de NaOH 0,1M.
- Agitar suavemente para que el pNP liberado sea extraído a la fase alcalina acuosa
- Se mide la absorbancia de la fase acuosa en espectrofotómetro a 410nm contra un blanco (NaOH 0,1M).
- Los análisis de actividad de transesterificación para las lipasas usadas se realizarán por duplicado.

- La unidad de transesterificación o síntesis (U_s) se define como la cantidad de enzima que transesterifica un micromol de pNPP por minuto a 40°C en hexano anhidro. Ver curva de calibrado y ejemplo de cálculo en el Anexo 1.

3.2.2 Determinación de actividad de hidrólisis

Existen metodologías para la cuantificación de actividad de hidrólisis que emplean pNPP disuelto en una mezcla de isopropanol, tampón fosfato pH 7,0, desoxiclorato de sodio y goma arábica (790 μ M de pNPP); sin embargo, la desventaja de estos métodos espectrofotométrico es que se obtiene turbidez en la solución, lo cual interfiere con la medición. Dicha complicación podría ser debido a la inmiscibilidad de pNPP en agua o a la liberación de ácidos grasos luego de la reacción. Para solucionar este problema se requiere de un ensayo laborioso que consume gran cantidad de tiempo (Gupta et al., 2002), razón por la que se ha optado por el uso de *p*-nitrofenilbutirato (pNPB) como sustrato de la reacción de hidrólisis, el que presenta mayor solubilidad en soluciones acuosas que el pNPP. De esta manera, la presente metodología se basa en la cuantificación de pNP producido mediante la hidrólisis enzimática de (pNPB) en medio acuoso (Cabrera et al., 2009).

El protocolo de medición de la actividad de hidrólisis comprende lo siguiente:

- Se pesan 4mg del polvo enzimático (polvo comercial que contiene la enzima no inmovilizada) o entre 4 y 20mg de CLEA de lipasa.
- Se adicionan 2mL de tampón fosfato 25mM pH 7,0 y se homogeniza la mezcla.
- Se toman muestras de entre 30 y 50 μ l (para enzima no inmovilizada) o entre 100 y 200 μ l (para el CLEA).
- Se agregan las muestras en celdas con 2,5mL de tampón fosfato 25mM pH 7,0, el que se encuentra previamente incubado a 30°C.
- Se agregan 20 μ l de solución de pNPB 50mM en acetonitrilo.
- Se mide la cinética de absorbancia en espectrofotómetro a 348nm y 30°C durante 3 minutos.

- Se cuantifica la pendiente de la curva en el rango lineal (unidades de absorbancia por minuto), la que se relaciona mediante la curva de calibrado con una concentración de pNP por unidad de tiempo (ver curva de calibrado en Anexo 2).
- Una unidad de hidrólisis (U_h) se define como la cantidad de enzima que hidroliza un micromol de pNPB por minuto a 30°C y pH 7,0 (ver ejemplo de cálculo y curva de calibrado en Anexo 2).

3.2.3 Determinación de proteína por BCA (ácido bicinonínico)

El objetivo es determinar la cantidad de proteína presente en los preparados comerciales en polvo y en los CLEAs, cuantificando así la actividad específica de síntesis. Esta metodología combina la reducción de Cu^{+2} a Cu^{+1} por la acción de proteínas en un medio alcalino (reacción de biuret) con la alta sensibilidad y selectividad de detección colorimétrica del catión cuproso (Cu^{+1}) usando un reactivo único que contiene ácido bicinonínico (Smith *et al.*, 1985). El producto de la reacción es de color púrpura y es formado por la quelación de dos moléculas de BCA con un ión cuproso. Este complejo soluble en agua muestra una fuerte absorbancia a 562nm, la que presenta una correlación lineal con el aumento de la concentración de proteína en un amplio rango (20-2000 μ g/mL).

La estructura macromolecular de las proteínas, el número de enlaces peptídicos y la presencia de cuatro aminoácidos en particular (cisteína, cistina, triptofano y tirosina) han sido reportados como los principales factores responsables de la formación de color con BCA (Wiechelman *et al.*, 1988). Por otra parte, este método no muestra interferencia por la presencia de detergentes como el tritón X-100 usado en la preparación de CLEAs, alcoholes y una gran cantidad de solventes orgánicos. Debido a esto se ha seleccionado como metodología de cuantificación de proteína en el presente estudio.

El kit comercial de BCA contiene los siguientes elementos:

- Solución A: Solución de carbonato de sodio, bicarbonato de sodio, ácido bicinonínico y tartrato de sodio en 0,1M de hidróxido de sodio.

- Solución B: Solución al 4% de sulfato cúprico
- Solución estándar de albúmina de suero bovino con una concentración de 2mg/mL en solución salina 0,9% y 0,05% de azida de sodio.

Las curvas de calibrado se realizan con diluciones de la solución estándar de albúmina entre 20 y 2000 μ g/mL.

Reactivo de trabajo: Mezcla de 50 partes de solución A con 1 parte de solución B.

Preparación de muestras y medición:

- En un eppendorf se agrega 1mL de reactivo de trabajo y 50 μ l de muestra de concentración desconocida
- Se agita para homogenizar la mezcla
- Se cubren los tubos y se incuban a 37°C por 30 minutos
- Enfriar los tubos a temperatura ambiente
- Medir la absorbancia de las muestras en espectrofotómetro a 562nm tomando como cero una celda con agua destilada.
- La medición de las muestras debe realizarse dentro de los primeros 10 minutos luego de ser enfriadas.

Para la cuantificación del porcentaje de proteína en un sólido, se siguen los siguientes pasos:

- Preparar una suspensión de concentración conocida.
- En un eppendorf se agrega 1mL de reactivo de trabajo y 50 μ l de la suspensión, para luego seguir el mismo procedimiento descrito anteriormente.
- Previo a la medición de la absorbancia, las muestras deben ser centrifugadas (2 minutos a 5000rpm).
- Mediante la curva de calibrado se puede calcular la concentración de proteína y posteriormente se puede calcular el porcentaje de proteína en el sólido. Ver curva de calibrado y ejemplo de cálculo en Anexo 3.

3.2.4 Microscopía óptica para determinación de tamaño de partícula de CLEAs de lipasa

Con el objetivo de visualizar los tamaños de los CLEA de lipasa preparados, se efectuará la observación directa al microscopio óptico (microscopio Nikon Eclipse 50i) de muestras de CLEA de lipasa en hexano anhidro. De este modo se obtendrán las imágenes digitales de los CLEAs, determinando posteriormente su tamaño promedio y desviación estándar mediante el uso del programa Imagetool versión 2.0. Ver ejemplos de imágenes en Anexo 4.

3.2.5 Determinación de perfil de ácidos grasos

Para determinar los ácidos grasos presentes en el aceite de raps/canola utilizado en el presente estudio, se realizó la siguiente metodología:

- Pesar aproximadamente 200mg de aceite en un tubo de ensayo.
- Disolver la muestra con 4mL de una solución metabólica 2M de hidróxido de potasio.
- Colocar a ebullición durante 5 minutos y luego enfriar.
- Adicionar 4mL de BF₃ metanólico y colocar a ebullición durante 5 minutos.
- Enfriar y adicionar 2mL de cloruro de sodio saturado.
- Colocar a ebullición durante 5 minutos y enfriar.
- Adicionar 2mL de hexano y disponer en viales con septa para cromatografía gaseosa.

Las condiciones operacionales para la medición son las siguientes:

- Cromatógrafo de gases con columna capilar HP-5 (Hewlett-Packard) 30m de largo, 0,25mm de diámetro interno y 5% de fenilmetilsilicona como fase estacionaria.
- Gas carrier: Helio
- Tamaño inyección de muestra: 1 μ L
- Split: 0,7mL/min
- Detector: FID (Flame Ionization detector)
- Programa de temperaturas del horno: Temperatura inicial 150°C, subir 5°C/min hasta alcanzar 220°C y mantener 15 minutos.

Del cromatograma se obtendrá el porcentaje de área que corresponde a cada ácido graso, lo que equivale al porcentaje en peso de cada ácido graso en la mezcla.

3.2.6 Determinación de mono, di y triglicéridos mediante cromatografía gaseosa

La presente metodología tiene como objetivo conocer la composición de acilglicéridos durante la reacción de producción de biodiesel. Con estos datos se puede calcular una estimación del rendimiento de conversión de alquil ésteres de ácidos grasos.

El método que se presenta a continuación se basa en la norma de caracterización de biodiesel EN 14105:

- Se pesan 100mg de la mezcla de reacción y se introducen en un matraz de aforo de 10mL
- Agregar a continuación 200 μ L de estándar interno (solución 8mg/mL de tricaprina en piridina).
- Agregar un volumen de 200 μ L del reactivo derivatizante (N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida).
- Dejar el matraz tapado en estufa a 80°C por 30 minutos.
- Retirar y dejar enfriar para luego agregar 8mL de heptano.
- Se homogeniza y se disponen 1,5mL en viales para cromatografía gaseosa.
- Para realizar la cromatografía gaseosa se utiliza una columna capilar Elite 5HT recubierta de una fase estacionaria (5%difenil) dimetilpolisiloxano, una longitud de 15m, diámetro interno de 0,32mm y un grosor de película 0,1 μ m.

Las condiciones operacionales para la medición son las siguientes:

- Tamaño de la muestra inyectada: 1 μ L
- Temperatura del inyector: 290°C
- Temperaturas en la columna: 1 minutos a 50°C, luego aumentar 15°C/min hasta alcanzar 180°C, posteriormente aumentar 7°C/min hasta alcanzar 230°C y finalmente elevar 10°C/min hasta 340°C y mantenerla durante 10 minutos.

- Temperatura del detector FID: 380°C
- Gas carrier: Hidrógeno
- Velocidad de flujo del gas carrier: 3mL/min

Las curvas de calibrado se realizan inyectando cuatro muestras de concentración conocida de monooleína, dioleína, trioleína y tricaprina. A partir de estas curvas se puede determinar el porcentaje en peso de estos compuestos en la muestra inicial y una estimación del porcentaje de conversión de alquil ésteres de ácidos grasos. Ver cromatograma y ejemplo de cálculo en Anexos 5 y 6 respectivamente.

3.3 Metodología experimental

3.3.1 Estabilidad de los biocatalizadores en presencia de metanol

Como se ha indicado en el capítulo 2, las lipasas suelen perder su capacidad catalítica al ser puestas en contacto con una mezcla de aceites o grasas y metanol insoluble. Esta metodología busca someter a las lipasas mostradas en la Tabla 3.1 a éstas condiciones pero en un medio no reactivo, lo que permitirá identificar a las lipasas que logran tolerar o mostrar mayor estabilidad en un medio que contenga hexano anhidro y metanol insoluble.

A continuación se detalla el protocolo para llevar a cabo la metodología:

- Preparar una suspensión de lipasa (entre 50 y 400mg) en 5mL de hexano anhidro.
- Agregar 175mL de metanol a la mezcla e introducir en baño a 40°C.
- Tomar muestras de la suspensión de lipasa para obtener actividad de síntesis a distintos tiempos. Previo a tomar la muestra se debe homogenizar la muestra. El tamaño de la muestra debe permitir obtener la masa de catalizador suficiente para realizar la medición de actividad de síntesis.
- Centrifugar la muestra de suspensión de lipasa y descartar el sobrenadante
- Previo a realizar la medición de actividad de transesterificación, dejar secar el sólido durante 15 minutos para que se evapore el hexano remanente.

- Medir la actividad de síntesis (según metodología 3.2.1) y graficar la actividad residual de síntesis en función del tiempo.
- Los resultados se expresan como tiempos de vida media a excepción de las lipasas que no alcanzan a inactivarse por sobre el 50 % de la actividad inicial, las cuales se expresan con el porcentaje de la actividad inicial que conservan hasta el final de la experiencia (ver tabla 4.1).

3.3.2 Determinación de cantidad de agente precipitante a utilizar en la elaboración de CLEA

Con el fin de establecer la cantidad mínima de cada agente precipitante necesaria para precipitar la mayor cantidad de proteína (actividad de hidrólisis) desde una solución enzimática, se propone la siguiente metodología:

- Para cada agente precipitante (*tert*-butanol, acetona, solución saturada de sulfato de amonio y polietilenglicol 600) se disponen 5 viales con 1mL de solución enzimática 50g/l de la lipasa comercial seleccionada para la elaboración de CLEAs.
- A cada vial se adicionan entre 1 y 5mL de cada precipitante.
- Se mantiene en agitación durante 30 minutos
- Se centrifugan las muestras durante 10 minutos a 8000rpm.
- Se toman 25 μ L del sobrenadante y se mide la actividad de hidrólisis según metodología 3.2.2.
- Se determina el volumen de agente precipitante necesario para precipitar la mayor parte de la actividad de hidrólisis desde la solución inicial, lo que implica que la actividad de hidrólisis en el sobrenadante sea cercana a cero.

3.3.3 Polimerización de glutaraldehído

El objetivo de la polimerización de glutaraldehído es evaluar la influencia de la utilización de un agente de entrecruzamiento de mayor peso molecular que el monómero de glutaraldehído sobre la actividad de síntesis y tamaño de partícula de los CLEAs de lipasa. Para generar el polímero de glutaraldehído se realizará el siguiente procedimiento:

- Disponer 5 mL de glutaraldehído 25%v/v (pH cercano a 2,8) en un frasco de vidrio.
- Agregar los volúmenes de base (solución de NaOH 1M) necesarios para obtener el glutaraldehído a distintos valores de pH entre 2,8 y 11,2 (ver Tabla 3.5) a temperatura ambiente.
- Luego de 5 minutos de agitación, se toman alícuotas para su uso en la etapa de entrecruzamiento.

Ver la diferencia en la polimerización de glutaraldehído a distintos valores de pH y el cálculo del ofrecimiento de grupos aldehído/grupos amino en el Anexo 7.

3.3.4 Oxidación de dextrano para el uso como agente de entrecruzamiento

Al igual que la metodología 3.3.3, lo que se busca es la oxidación de dextrano para generar una molécula de alto peso molecular (100 a 200 kDa) con grupos aldehído y evaluar su uso como agente de entrecruzamiento en la preparación de CLEAs de lipasa.

A continuación se presenta el protocolo de oxidación de dextrano para la obtención de dextrano aldehído:

- Se disuelven 1,65g de dextrano (100 a 200kDa) en 50mL de agua.
- Se adicionan a la solución 3,85g de metaperyodato de sodio.
- Se agita la mezcla a temperatura ambiente durante 90min.
- Para retirar el exceso de metaperyodato que no reaccionó se llevan a cabo diálisis consecutivas. La membrana de diálisis utilizada posee un corte de 12kDa y se realiza contra 5L de agua destilada a temperatura ambiente durante 2h bajo agitación.
- Se repite la diálisis 5 veces cambiando el agua.
- El volumen final de dextrano polialdehído obtenido es de aproximadamente 56mL (Mateo *et al.*, 2004).

3.3.5 Metodología para la producción de CLEA

La presente metodología se basa en el estudio de Kumari y colaboradores (Kumari *et al.*, 2007) que han utilizado CLEAs de lipasa como biocatalizador de la síntesis de biodiesel y han obtenido altos rendimientos de conversión.

A continuación se muestran los pasos del protocolo de fabricación de CLEAs de lipasa:

- Se preparan 4mL de solución de lipasa comercial en tampón fosfato 25mM pH 7,0 a una concentración de 50g/l.
- La solución se mantiene a 4°C.
- Se agrega tritón X-100 para lograr una concentración final de 0,1%.
- Se agregan distintas cantidades de albúmina según lo requerido en la Tabla 3.5.
- Agregar lentamente la cantidad de agente precipitante calculada a partir de la metodología 3.3.2 manteniendo agitación durante 30 minutos.
- Se agrega un volumen de una solución de glutaraldehído al 25%v/v a pH y concentración final determinados en la metodología 3.3.6, dejando en agitación durante 1h.
- Finalmente se centrifuga 1 vez con tampón fosfato 25mM pH 7,0 para lavar el CLEA y 2 veces con acetona para obtener un biocatalizador con bajo contenido de agua.
- El rendimiento de inmovilización respecto a la actividad (RI_a) se define como el porcentaje de actividad que se obtiene luego del proceso de inmovilización con respecto a la actividad inicial.
- El rendimiento de inmovilización respecto a la masa (RI_m) se define como el porcentaje de masa obtenida al finalizar la inmovilización respecto a la masa de lipasa comercial en polvo con la que se comenzó la inmovilización.

3.3.6 Metodología de superficie respuesta (MSR)

Para la optimización de las variables del proceso de elaboración de CLEAs de lipasa, se ha planteado utilizar el método de superficie de respuesta.

El objetivo es analizar el efecto del pH del glutaraldehído, la concentración de glutaraldehído y la razón enzima/albúmina (razón másica entre la lipasa comercial y albúmina de suero bovino) sobre la actividad específica de síntesis de los CLEAs de lipasa.

Se realizará un diseño de segundo orden, de tipo central compuesto. Este diseño es el más utilizado debido a su gran flexibilidad y se compone de tres tipos de puntos (Gutiérrez y de la Vara, 2004):

- Una replica de un diseño factorial en dos niveles. A esta parte se le llama porción factorial.
- n_0 puntos o repeticiones al centro del diseño, con $n_0 \geq 1$.
- Dos puntos sobre cada eje a una distancia α del origen. Estos puntos son llamados porción axial.

El número total de experimentos (N) se calcula de la siguiente forma:

$$N = 2^k + 2 \cdot k + n_0$$

Considerando que se realizarán seis repeticiones del punto central (n_0) y k es el número de factores (variables) ($k=3$), el valor de N es de 20 experimentos.

La distancia que existe entre α y el origen para tres variables se calcula de la siguiente forma:

$$\alpha = (F)^{1/4}$$

Donde F es la cantidad de experimentos de la porción factorial.

$$F = 2^k = 2^3 = 8$$

entonces,

$$\alpha = (8)^{1/4} = 1,68$$

A continuación se muestra la Tabla 3.4, que muestra el diseño central compuesto utilizado para la optimización, con cinco niveles para cada variable (-1,68, -1, 0, 1, 1,68) y 20 experimentos. En la Tabla 3.5 se presentan las equivalencias entre los niveles y el valor de las variables consideradas en el diseño.

Tabla 3.4 Diseño central compuesto para tres variables codificadas independientes

Experimento	pH	Concentración glutaraldehído (mM)	Razón enzima/albúmina (mg/mg)
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0
12	-1,68	0	0
13	1,68	0	0
14	0	-1,68	0
15	0	1,68	0
16	0	0	-1,68
17	0	0	1,68
18	0	0	0
19	0	0	0
20	0	0	0

Tabla 3.5 Equivalencia de los niveles con los valores que adquiere cada variable

Nivel	pH	Concentración de glutaraldehído (mM)	Razón enzima/albúmina (mg/mg)
-1,68	2,8	8,2	1,6
-1	4,5	15,0	5,0
0	7,0	25,0	10,0
1	9,5	35,0	15,0
1,68	11,2	41,8	18,4

3.3.7 Cuantificación de la actividad residual de hidrólisis en el CLEA de lipasa luego de inactivación térmica

La inactivación térmica de CLEAs de lipasa en medio acuoso sirve para determinar indirectamente la intensidad de unión de los agregados enzimáticos con el agente de

entrecruzamiento, que es lo que le confiere estabilidad estructural al CLEA. Al realizar pruebas de estabilidad térmica con CLEAs de lipasa, parte de los agregados enzimáticos que no han quedado bien entrecruzados, se solubilizan en el medio acuoso, lo que conlleva a una pérdida de masa de CLEA en suspensión. La presente metodología se ha considerado para determinar la actividad residual de hidrólisis remanente en el biocatalizador en suspensión luego de una experiencia de inactivación térmica de 50 h a 60°C (temperatura a la que las lipasas muestran una disminución de su estabilidad de acuerdo a los datos obtenidos de los proveedores). Esta medición mostrará el porcentaje de actividad que permanece en el CLEA luego de la inactivación térmica, lo que da una medición indirecta del grado de entrecruzamiento del CLEA.

A continuación se enuncian los pasos a seguir para llevar a cabo la metodología:

- Preparar suspensiones de CLEA en tampón fosfato pH 7,0 25mM a una concentración de 10mg/mL.
- Disponer las muestras en baño a 60°C.
- El porcentaje de “actividad residual de la suspensión” se obtiene tomando muestras de la suspensión y midiendo su actividad de hidrólisis a distintos tiempos entre 0 y 50h (según metodología 3.2.2).
- Centrifugar la suspensión y medir la actividad de hidrólisis del sobrenadante (según metodología 3.2.2) a las 50h.
- El porcentaje de “actividad residual en el CLEA” es calculado midiendo la actividad de hidrólisis de la suspensión (actividad del CLEA + actividad del sobrenadante) y del sobrenadante a las 50 h, obteniendo por diferencia la actividad de hidrólisis que permanece en el CLEA.
- Para estimar el porcentaje de esta “actividad residual en el CLEA” y “actividad residual de la suspensión”, se toma como referencia la actividad de hidrólisis inicial de la suspensión (ver ejemplo de cálculo en Anexo 8).

3.3.8 Metodología para la producción de CLEA hidrofóbico

La presente metodología se basa en la solicitud de patente perteneciente a CLEA Technologies (Schoevaart *et al.*, 2008).

A continuación se muestra el protocolo para la elaboración del CLEA hidrofóbico:

- A 10mL de una solución enzimática de lipasa en tampón fosfato 25mM pH 7,0 se agregan 10mL de una solución de metaperyodato 300mM, activando la superficie de la lipasa con grupos aldehído mediante oxidación durante 1h a temperatura ambiente.
- Se precipita la lipasa con acetona (cantidad determinada en metodología 3.3.2 y se deja en agitación durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- Se adicionan 3,5mL de una solución acuosa 100mM del agente de entrecruzamiento que contiene grupos amino (1,3-diamino-2-hidroxiopropano, m-xililenediamina o hexametilenediamina) y se deja en agitación a temperatura ambiente durante 10 minutos.
- Adicionar 3,5mL de borohidruro de sodio (100mM) y dejar 1h a temperatura ambiente.
- Agregar 2,5mL de fluoruro de sodio 1M.
- Agregar 1mL del alcoxilano (PTES, TMMS, TMPS o TES), dejando bajo agitación durante 12h.
- Finalmente se agregan 25mL de agua destilada y se filtra el CLEA en un crisol filtrante P4, para posteriormente lavarlo una vez con 40mL de agua y tres veces con 30mL de acetona.

3.3.9 Reacción de transesterificación en modalidad por lote

Para llevar a cabo cada uno de los experimentos que tienen por objetivo cuantificar el rendimiento de conversión de biodiesel, se llevará a cabo la reacción de transesterificación según la siguiente metodología:

- En un vial se agregan 1g de aceite de raps (PM promedio de los triglicéridos del aceite de raps= 884g/mol). Cada vial representa un tiempo de reacción.
- Agregar 100mg de CLEA de lipasa (10%p/p del CLEA de lipasa respecto al aceite según lo reportado por Kumari *et al.*, 2007).
- Se mantiene la suspensión a 40°C con agitación constante de 200rpm.
- Luego de temperar la mezcla, se agrega metanol o etanol a una razón molar

alcohol:aceite de 4:1.

- Se retira cada vial a un tiempo determinado y se centrifuga la muestra
- Se toma el sobrenadante y se mide posteriormente la conversión de alquil ésteres de ácidos grasos mediante la metodología 3.2.6.
- El rendimiento de conversión de alquil ésteres de ácidos grasos se define como el porcentaje en peso de alquil ésteres de ácidos grasos dentro de una muestra. Ver ejemplo de cálculo en Anexo 5

3.3.10 Optimización de la síntesis de biodiesel

Se llevarán a cabo reacciones de transesterificación de aceite de raps en modalidad por lotes a diferentes condiciones de operación con el propósito de encontrar las mejores condiciones para la producción de alquil ésteres de ácidos grasos.

Para elaborar el diseño, se mantendrá constante la temperatura en 40°C, la razón molar alcohol:aceite en 4:1 y la razón másica enzima/sustrato (E/S) de 0,1 debido a que una gran cantidad de estudios han determinado que éstas condiciones se suelen ser las óptimas o se usan en forma ya estandarizada como lo es la razón E/S lo que permitirá que los resultados obtenidos sean comparables (Chang *et al.*, 2005; Kumari *et al.*, 2007; Shao *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2004). Sin embargo, se planteó corroborar la temperatura óptima testeando temperaturas de 30°C, 40°C y 50°C y la razón E/S a valores menores que 0,1 (0,05 y 0,01) ya que lo que se busca es utilizar la menor cantidad de CLEs para producir altos rendimientos de conversión de alquil ésteres de ácidos grasos (altas productividades).

Por otra parte, las variables a considerar en el diseño experimental son las siguientes: tipo de alcohol (metanol o etanol), presencia de agua en el medio de reacción (0%p/p y 5%p/p) (Kumari *et al.*, 2007; Shao *et al.*, 2008), presencia de co-solvente en el medio de reacción (sin co-solvente o con *tert*-butanol como co-solvente, 1:1 respecto al volumen de aceite), uso de aceite refinado o sin refinar (ambos procedentes de raps). Se usará un diseño factorial de dos niveles y 4 variables, lo que implica la realización de 16 experimentos como se muestra en la Tabla 3.6. Cada experimento consta de una cinética de reacción entre 0 y 3 horas con lo que se determinará el máximo potencial de conversión de alquil ésteres de ácidos grasos al cabo de dicho tiempo.

Para la cuantificación exacta de la conversión, además de considerar los acilglicéoles se

deben cuantificar los ácidos grasos libres producidos en cada reacción, los que se determinan de la siguiente manera:

- Pesar en un matraz de 250mL un mínimo de 2g de muestra.
- Poner en un matraz 100mL de una solución isopropanol/hexano 1:1 v/v.
- Adicionar al matraz con solventes unas gotas de solución indicadora de fenolftaleína (1%p/v en etanol 90%) y calentar la solución a 40°C.
- Verter la solución de solventes en el matraz con la muestra y agitar para homogenizar.
- Usar solución 0,1g/l de NaOH para titular la muestra.
- Cuantificar el volumen de la solución de NaOH empleado para que la muestra cambie de incoloro a rosado. Ver ejemplo de cálculo en Anexo 9.

Tabla 3.6 Diseño factorial 2^4 para encontrar las mejores condiciones de producción de biodiesel

Experimento	Alcohol	Aceite de raps/canola	Co-solvente en medio de reacción	Agua en medio de reacción (%)
1	Metanol	Refinado	<i>Tert</i> -butanol	0
2	Metanol	Refinado	<i>Tert</i> -butanol	5
3	Metanol	Refinado	Sin co-solvente	0
4	Metanol	Refinado	Sin co-solvente	5
5	Metanol	No refinado	<i>Tert</i> -butanol	0
6	Metanol	No refinado	<i>Tert</i> -butanol	5
7	Metanol	No refinado	Sin co-solvente	0
8	Metanol	No refinado	Sin co-solvente	5
9	Etanol	Refinado	<i>Tert</i> -butanol	0
10	Etanol	Refinado	<i>Tert</i> -butanol	5
11	Etanol	Refinado	Sin co-solvente	0
12	Etanol	Refinado	Sin co-solvente	5
13	Etanol	No refinado	<i>Tert</i> -butanol	0
14	Etanol	No refinado	<i>Tert</i> -butanol	5
15	Etanol	No refinado	Sin co-solvente	0
16	Etanol	No refinado	Sin co-solvente	5

4 Resultados

4.1 Determinación de actividad específica de síntesis y estabilidad en hexano anhidro y presencia de metanol

En la Tabla 4.1 se muestra el porcentaje de proteína presente en cada extracto enzimático comercial en polvo (metodología 3.2.3), su actividad específica de síntesis (metodología 3.2.1) y estabilidad en presencia de metanol (metodología 3.3.1), representada por el tiempo de vida media. Para calcular los tiempos de vida media se calcula la regresión no lineal de los datos de la estabilidad en presencia de metanol en condiciones no reactivas mediante el programa SPSS versión 8.0 (los que en la mayoría de los casos se ajustan a inactivaciones bifásicas) y se obtienen los datos de las constantes de inactivación para determinar el valor del tiempo de vida media. Las 7 primeras lipasas de la Tabla 4.1 fueron evaluadas durante 30 minutos, mostrando una inactivación total a partir de los 15 minutos. En el caso de las lipasas PS y SL, las enzimas mostraron una alta estabilidad frente a la presencia de metanol en medio orgánico, siendo evaluadas por un tiempo total de 24h. Sin embargo, en el caso de la lipasa PS la actividad no bajó del 90% durante 24h. Esto no permite cuantificar el tiempo de vida media, pero si permite determinar que la lipasa PS es la más estable.

Tabla 4.1 Caracterización de las lipasas comerciales estudiadas respecto a su contenido de proteína, actividad de síntesis y tiempos de vida media de inactivaciones en hexano anhidro a 40°C con 27 g/L de metanol.

Lipasa comercial	Microorganismo productor	Proteína en extracto comercial (%p/p)	Actividad específica de síntesis (U _s /g proteína)	Tiempo vida media (h)
L34P	<i>Candida rugosa</i>	10,5	2,1	0,08
L166P	<i>Mucor javanicus</i>	25,1	2,2	0,09
L691P	<i>Candida sp./Rhizopus sp.</i>	11,0	3,0	0,08
L768P	Mezcla lipasas de hongos	22,8	3,8	0,09
AK	<i>Burkholderia fluorescens</i>	12,9	16,9	0,09
AYS	<i>Candida rugosa</i>	4,2	7,8	0,10
R	<i>Rhizopus oryzae</i>	22,6	0,4	0,10
SL	<i>Burkholderia cepacia</i>	27,3	433,2	20,5
PS	<i>Burkholderia cepacia</i>	4,7	1290,7	n.d.

n.d.: No determinado. Conserva el 90% de la actividad inicial entre las 7 y 24 h.

Según los resultados de la Tabla 4.1, la lipasa PS es la que muestra la mayor actividad específica de síntesis (en la reacción de transesterificación) y mejor estabilidad en presencia de metanol, representando la mejor alternativa para su aplicación en la producción de biodiesel.

4.2 Determinación de las condiciones iniciales de elaboración de CLEAs previo a la optimización de la actividad de síntesis

En la presente sección se presentan los resultados de la determinación de las condiciones iniciales para la elaboración de CLEAs de lipasa PS. Por otra parte, se realizan las experiencias para identificar el tipo y cantidad de precipitante a utilizar en la preparación del biocatalizador, así como la estabilidad de la lipasa PS en diferentes condiciones de pH para evaluar si la adición de glutaraldehído a distintos valores de pH puede mermar la capacidad catalítica de la lipasa.

4.2.1 Cuantificación de lisinas en la superficie de lipasa PS

Para tener una estimación de la necesidad de adición de albúmina de suero bovino a la preparación del CLEA, se han cuantificado los residuos de lisina presentes en la superficie de la lipasa de *B. cepacia*. Si bien esta lipasa fue la seleccionada, fue la que menos residuos de lisina presenta en comparación a las lipasas testeadas en el punto 4.1.1, haciendo que la adición de albúmina tenga sentido. Para cuantificar los residuos de lisina, se buscaron las secuencias aminoacídicas de las lipasas en la base de datos de PubMed. En el caso de la lipasa de *B.cepacia* se encontró la estructura cristalizada en Protein Data Bank (nombre de búsqueda 3LIP), y mediante el programa PyMol se pudo determinar la cantidad y ubicación de los residuos de lisina que se encuentran en la superficie de la enzima, así como los aminoácidos correspondientes al sitio activo. A continuación se muestra la Figura 4.1, en la que se aprecian solamente siete lisinas disponibles para realizar el entrecruzamiento, lo que ha mostrado ser insuficiente para obtener un buen entrecruzamiento en la preparación de CLEAs de lipasa (Shah, *et al.*, 2006). Cabe destacar que estas lisinas se encuentran en sitios no muy próximos al sitio activo.

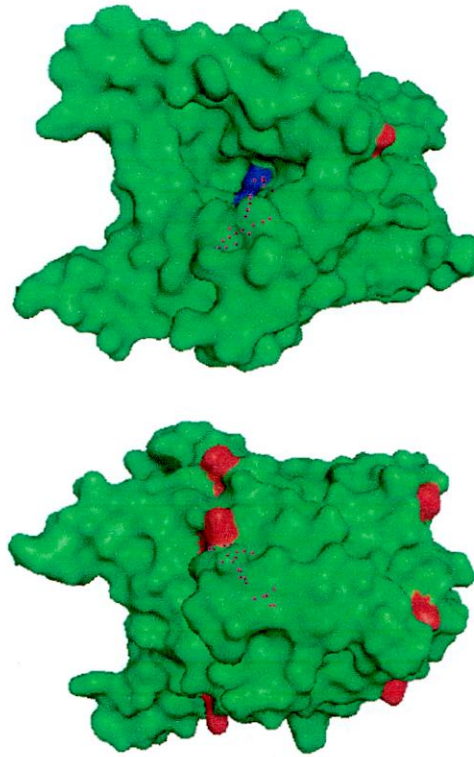


Figura 4.1 Vista delantera (arriba) y trasera (abajo) de la superficie de lipasa de *B. cepacia* mostrando los residuos de lisina en rojo y los aminoácidos del sitio activo en azul (Serina 87, Ácido aspártico 264, Histidina 286) (Lang *et al.*, 1998).

4.2.2 Estabilidad de la solución enzimática de la lipasa PS a distintos valores de pH

La solución enzimática a partir de la cual se prepararán los CLEA entrecruzados con glutaraldehído, es previamente ajustada a un valor de pH cercano al de la solución de glutaraldehído utilizada (según se indica en Tabla 3.5). Para poder realizar estas experiencias se debe determinar primero la estabilidad de la solución enzimática a los distintos pH. Estas estabilidades se muestran en la Figura 4.2.

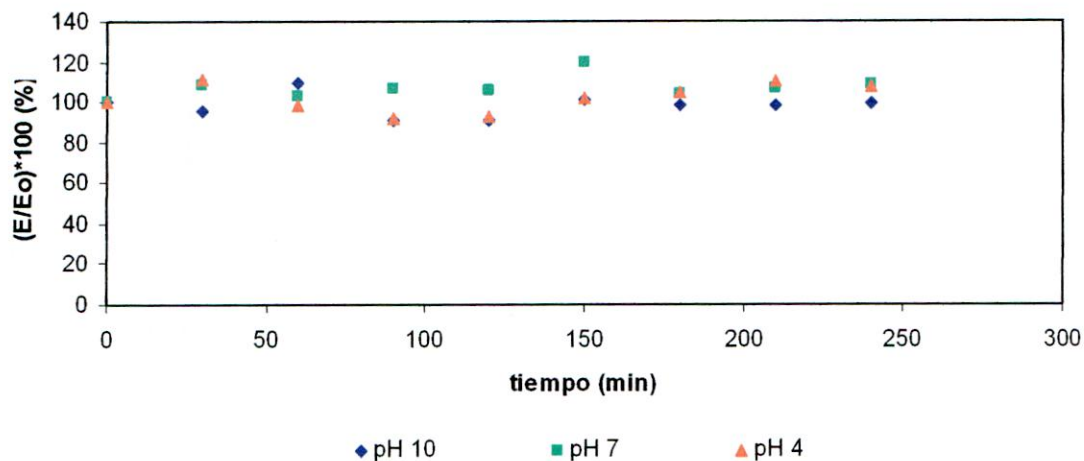


Figura 4.2 Estabilidad de la lipasa PS a 40°C (temperatura óptima de acuerdo al proveedor) y distintos valores de pH. Las curvas representan el porcentaje de actividad de hidrólisis remanente en la suspensión función del tiempo y respecto a la actividad inicial.

Los resultados mostrados en la Figura 4.2 muestran que el pH no incide mayormente en la estabilidad de la lipasa PS, lo que hace que el uso de glutaraldehído a distintos valores de pH en la elaboración de CLEAs tenga un efecto sólo por la presencia de las diferentes especies del glutaraldehído presentes (polímeros, monómeros o hemiacetales cíclicos de glutaraldehído).

4.2.3 Requerimiento de agente precipitante

Con el objeto de seleccionar el agente precipitante para la elaboración de CLEAs de lipasa PS se han tomado en cuenta distintos criterios. Uno de ellos se muestra en la Figura 4.3, en la cual se determina la cantidad de precipitante necesaria para remover la mayor cantidad de actividad de hidrólisis desde la solución enzimática.

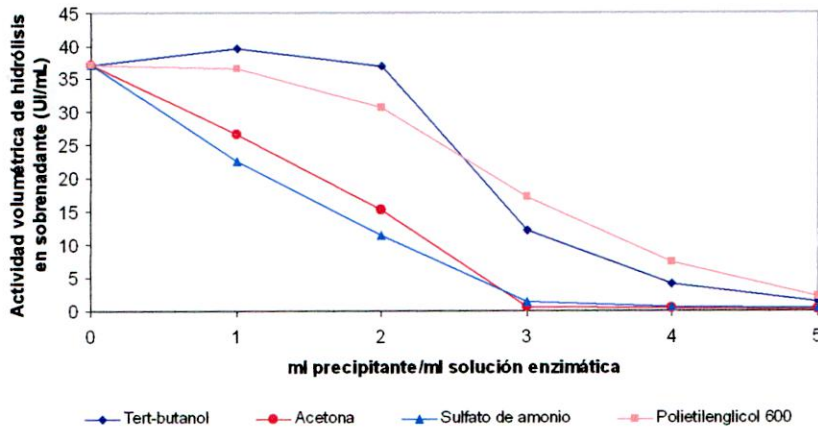


Figura 4.3 Agente precipitante necesario para precipitar la lipasa desde una solución enzimática. La experiencia de precipitación se realizó a 4°C.

Otro criterio para determinar el agente precipitante que se usará en la elaboración de CLEAs de lipasas PS es el rendimiento de inmovilización respecto a la actividad de síntesis (RI_a). En la Figura 4.4 se puede observar el RI_a en función de la actividad de hidrólisis y síntesis para el uso de cada agente precipitante en la elaboración de CLEAs de lipasa con glutaraldehído 25%v/v (obtenido desde el proveedor a ésta concentración) como agente de entrecruzamiento. Se comparan los rendimientos considerando ambas actividades con el propósito de destacar la necesidad de realizar la selección en función de la actividad de síntesis, ya que en caso de tomar como criterio de selección la actividad de hidrólisis la selección del agente precipitante cambiaría. Las condiciones a las cuales se preparan estos biocatalizadores son las mencionadas en la metodología 3.3.5. Para cada precipitante se han preparado dos CLEAs en replicas independientes. Para cada experiencia se utiliza un volumen inicial de 4mL de una solución enzimática de lipasa PS comercial de 50mg/mL.

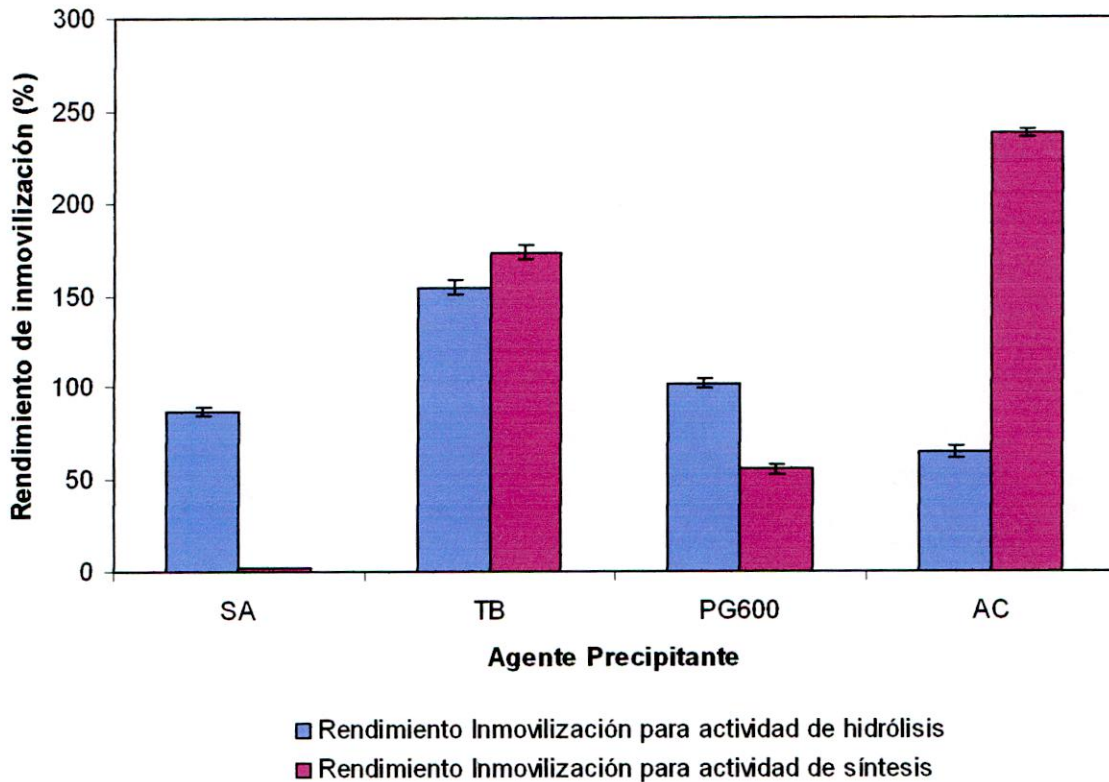


Figura 4.4 Rendimientos de inmovilización con distintos agentes precipitantes. SA: Sulfato de amonio, TB: tert-butanol, PG600: Polietilenglicol 600, AC: Acetona. La razón enzima/albúmina fue de 10mg/mg, el glutaraldehído se encuentra a pH 2,8, la concentración del glutaraldehído es de 25mM, la razón másica glutaraldehído/proteína (lipasa+albúmina) es de 1,72 y la temperatura de 4°C.

Según los resultados se puede apreciar que los mayores valores de RI_a considerando la actividad de síntesis (relacionada a la reacción de transesterificación de *p*NPP con etanol, ver metodología 3.2.1) son los obtenidos utilizando acetona y *tert*-butanol. De esta forma, se selecciona la acetona debido a su mayor valor de RI_a considerando la actividad de síntesis, menor requerimiento en volumen para precipitar la mayor cantidad de lipasa desde la solución enzimática y por último debido a que representa un bajo costo en comparación al *tert*-butanol (10 veces menos costosa aproximadamente). Una posible explicación para la hiperactivación de la lipasa PS al ser sometida a precipitación es que cada agente precipitante podría provocar diferentes cambios conformacionales de la enzima. Por otra parte, una de las razones por las cuales puede privilegiarse la actividad de hidrólisis por sobre la de síntesis o viceversa, es el contenido de agua en el CLEA de lipasa. Al respecto, se ha determinado que los CLEAs cuya lipasa ha sido precipitada con polietilenglicol, sulfato

de amonio, *tert*-butanol y acetona, poseen humedades de 86%, 36%, 7,9% y 6,8% respectivamente. De esta forma, el CLEA que contiene menor humedad es el que presenta una mayor actividad específica de síntesis y menor actividad específica de hidrólisis (calculado tanto en peso húmedo como en peso seco). Esta evidencia indica que CLEAs con más de 36% de humedad privilegian la actividad de hidrólisis por sobre la síntesis, lo que podría tener sus bases en que las lipasas al estar presentes en medios con alta cantidad de agua, hacen que el "lid" se cierre y deje pasar sólo sustratos de bajo peso molecular (privilegiando el paso de pNPB por sobre el pNPP). Al contrario, si están presentes en medios con menor cantidad de agua y son lavadas con solventes orgánicos como acetona y *tert*-butanol, el "lid" podría permanecer más abierto, permitiendo el paso de una molécula de mayor tamaño (pNPP) hacia el sitio activo de la lipasa, expresando así mayor actividad de síntesis.

4.3 Optimización de las variables involucradas en la elaboración de CLEAs de lipasa PS evaluando el efecto del pH de la solución de glutaraldehído como agente de entrecruzamiento

La optimización de la preparación de CLEAs en función de la actividad de síntesis se ha llevado a cabo mediante la metodología 3.3.6. Los puntos centrales de cada variable se basaron en el estudio de Kumari y colaboradores (2007), los que tienen por objeto la aplicación de un CLEA de lipasa PS en la producción de biodiesel. Sin embargo, inicialmente se intentó trabajar sin la adición de albúmina en la preparación del CLEA de lipasa PS, resultando bajos valores de actividad de síntesis (30 U_s/g CLEA), lo que justifica la incorporación de albúmina. A continuación en la Tabla 4.2 se muestran los resultados del diseño central compuesto. Adicionalmente se han caracterizado los biocatalizadores en función de la actividad de hidrólisis y tamaño de partícula para poder obtener información respecto a la relación entre éstas variables, lo que se discutirá en el capítulo 5.

La medición del tamaño de partícula y las actividades tanto de síntesis como de hidrólisis se realizaron en triplicado. Para determinar el tamaño de partícula se considera una muestra de entre 30 y 45 partículas de las cuales se obtiene el tamaño promedio y la desviación estándar. El análisis de ANOVA para las tres respuestas del diseño de la Tabla 4.2 se muestra en el Anexo 10.

Tabla 4.2 Resultados del diseño central compuesto considerando la medición del tamaño de partícula y la actividad de síntesis e hidrólisis de los CLEAs de lipasa PS

pH glutalaldehído	CLEA		Actividad específica de hidrólisis (U _h /g CLEA)	Actividad específica de síntesis (U _s /g CLEA)	Tamaño partícula (μm)
	Razón enzima/albúmina (mg/mg)	Concentración glutalaldehído (mM)			
2,8	10	25	57,6	64,1	24,7±9
4,5	5	15	33,9	127,3	25,8±8,7
		35	21,2	115,3	26,9±9,4
	15	15	47,9	105,55	27,1±7,9
		35	44,5	127,3	21,2±5,1
7	10	25	17,7	127,5	47,6±18,9
	10	25	21,3	130,5	43,4±16,8
	10	25	18,5	132,4	42±15,9
	10	25	19,4	128,2	48,1±20,2
	10	25	18,1	129,7	47,3±16,6
	10	25	21,1	133,1	45,6±18,5
	10	41,8	26,6	127,3	54,4±24,1
	10	8,2	123,9	48,1	24,6±7,2
	18,4	25	43,6	120,4	23,1±4,7
	1,6	25	26,4	120,4	91±26,9
9,5	5	15	14,9	130,4	33,3±9,4
		35	14,7	143,8	83,4±24,9
	15	15	26,3	139,1	57,9±23,8
		35	36,9	143,9	57,2±21
11,2	10	25	31,7	127,3	55,4±18,9

Los resultados de estos experimentos fueron analizados por regresión lineal múltiple.

Con el objeto de simplificar los cálculos utilizados en la regresión lineal múltiple se trabajó con álgebra de matrices. El modelo cuadrático para tres variables independientes es el siguiente:

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^2 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 \quad (\text{Ec. 4.1})$$

Para hallar los coeficientes de la ecuación (b_i) se procedió a construir la matriz Y con las variables dependientes (resultados de cada experimento) y la matriz X con las variables independientes (los valores de $-1,68$, -1 , 0 , 1 y $1,68$ para cada uno de los experimentos) de la siguiente forma:

$$Y = \begin{pmatrix} y_1 \\ y_2 \\ \cdot \\ \cdot \\ \cdot \\ \cdot \\ y_n \end{pmatrix} \quad X = \begin{pmatrix} 1 & x_{11} & x_{21} & x_{31} & x_{11}^2 & x_{21}^2 & x_{31}^2 & x_{11}x_{21} & x_{11}x_{31} & x_{21}x_{31} \\ 1 & x_{12} & x_{22} & x_{32} & x_{12}^2 & x_{22}^2 & x_{32}^2 & x_{12}x_{22} & x_{12}x_{32} & x_{22}x_{32} \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ 1 & x_{1n} & x_{2n} & x_{3n} & x_{1n}^2 & x_{2n}^2 & x_{3n}^2 & x_{1n}x_{2n} & x_{1n}x_{3n} & x_{2n}x_{3n} \end{pmatrix}$$

donde y_n es el valor experimental de la variable dependiente en el experimento n -ésimo, y x_{mn} es el valor de la variable independiente m en el experimento n -ésimo. Se define B como la matriz que contiene los valores de los coeficientes b_i de la ecuación 4.1:

$$B = \begin{pmatrix} b_0 \\ b_1 \\ b_2 \\ b_3 \\ b_{11} \\ b_{22} \\ b_{33} \\ b_{12} \\ b_{13} \\ b_{23} \end{pmatrix}$$

De esta forma, la matriz B se puede calcular como sigue:

$$B = (X'X)^{-1}(X'Y) \quad \text{Ec. 4.2}$$

Para resolver esta ecuación, que implica el cálculo de la matriz inversa de 20×10 , se utilizó el software MatLab versión 5.3. Los valores obtenidos de B según la ecuación 4.2, se reemplazaron en la ecuación 4.1, con lo que el modelo cuadrático queda completamente definido como se muestra a continuación:

$$\begin{aligned}
 \text{Actividad}_{(U_S / g_{CLEA})} &= 126,8 + 13,76 \cdot pH + 11,79 \cdot G - 0,07 \cdot R - 5,12 \cdot pH^2 \quad \text{Ec. 4.3} \\
 &- 7,96 \cdot G^2 + 3,63 \cdot R^2 + 1,06 \cdot pH \cdot G + 2,31 \cdot pH \cdot R + 3,13 \cdot G \cdot R
 \end{aligned}$$

Donde:

pH: pH de la solución de glutaraldehído

G: Concentración de glutaraldehído en la preparación del CLEA de lipasa

R: Razón enzima/albúmina

La ecuación 4.1 fue evaluada para toda la región experimental considerada en este estudio, definida por los rangos dados para las tres variables independientes (pH, G y R). Esta ecuación se graficará construyendo una matriz de 36x36 en donde cada elemento tomó el valor de la ecuación 4.1 evaluada para dos de las variables dependientes y dejando la tercera en un valor fijo dado. Esto se puede representar como sigue:

$$A \Big|_{x_3} = \begin{pmatrix}
 y_{1,1} \Big|_{x_{1,1}; x_{2,1}; x_3^*} & y_{1,2} \Big|_{x_{1,2}; x_{2,1}; x_3^*} & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & y_{1,36} \Big|_{x_{1,36}; x_{2,1}; x_3^*} \\
 y_{2,1} \Big|_{x_{1,1}; x_{2,2}; x_3^*} & y_{2,2} \Big|_{x_{1,2}; x_{2,2}; x_3^*} & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & y_{2,36} \Big|_{x_{1,36}; x_{2,2}; x_3^*} \\
 \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\
 \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\
 \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\
 y_{36,1} \Big|_{x_{1,1}; x_{2,36}; x_3^*} & y_{36,2} \Big|_{x_{1,2}; x_{2,36}; x_3^*} & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & y_{36,36} \Big|_{x_{1,36}; x_{2,36}; x_3^*}
 \end{pmatrix}$$

La matriz A estará definida por los valores que toma “y” en función de las variables independientes G y R para un valor dado de la variable independiente (pH igual a 11,2). Se identificó que al aumentar el pH del glutaraldehído se lograba mayor actividad de síntesis en el biocatalizador, pero debido a la imposibilidad técnica de continuar aumentando el valor de esta variable (por la consecuente precipitación del glutaraldehído), se decidió que ésta se conservaría fija en su mayor valor para obtener la matriz A. Los valores $y_{i,j}$ se definen de acuerdo a la ecuación 4.1 evaluada en todo el rango experimental de x_1 ($x_{1,j}$) y x_2 ($x_{2,i}$), donde i y j son números enteros desde 1 a 36 y corresponden a la división en 36 partes iguales del rango que va desde -1,68 hasta 1,68.

Los valores óptimos para la superficie de respuesta fueron hallados maximizando la ecuación 4.1 utilizando la herramienta *Solver* del software Microsoft Excel versión 9.0, con los siguientes parámetros: Iteraciones: 200; Precisión: 0,000001; Tolerancia: 2%; Convergencia: 0,0001. Los valores óptimos obtenidos de cada variable son:

$$pH = 11,2$$

$$G = 36,8mM$$

$$R = 18,4mg_{enzima} / mg_{albúmina}$$

Estos valores óptimos entregan un valor de actividad de 163,3 U_s/g_{CLEA} al ser reemplazados en la ecuación 4.3. Al preparar el CLEA de lipasas PS a las condiciones óptimas se obtiene una actividad de síntesis de 173,8 U_s/g_{CLEA}. Se debe señalar que también se ha calculado el rendimiento de inmovilización de dicho CLEA considerando la masa inicial de polvo enzimático comercial (1,8% de humedad) y a masa final del CLEA (6,8% de humedad), obteniéndose valores de RI_m en base húmeda cercanos al 100%. Además, tomando en cuenta que el porcentaje de proteína del polvo enzimático comercial sin inmovilizar es de 4,5% (calculado según metodología 3.2.3) y que se adicionan 10,7 mg de albúmina a la preparación de CLEA por cada 200 mg de polvo enzimático comercial (9 mg de proteína en 196,4 mg de polvo enzimático comercial en base seca), el CLEA final debería contener teóricamente un 9,5% de proteína en base seca. El CLEA resultante posee 186,2 mg en base seca, de los cuales 13,8 mg (3,9% en base húmeda) son proteína (albúmina y lipasa), por lo tanto el CLEA posee un 7,4% de proteína en base seca.

Usando el software OriginPro 7.0 se ha podido graficar la superficie de respuesta que corresponde a la matriz "A" al mantener la variable pH fija en el valor 11,2. A continuación se muestra la Figura 4.5 que representa a dicha superficie.

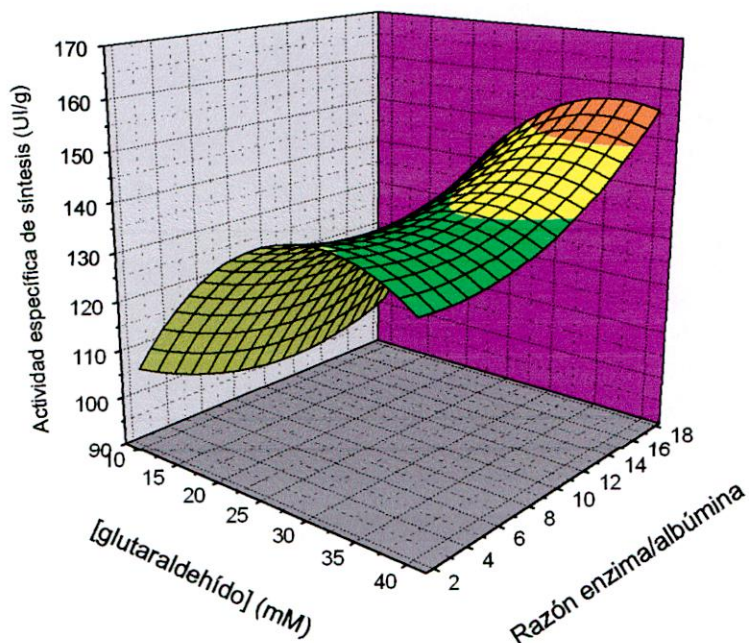


Figura 4.5 Superficie de respuesta resultante al mantener constante la variable pH en el valor 11,2

En la Tabla 4.3 se muestran los valores del porcentaje de actividad residual de la suspensión de CLEA luego de 50h en medio acuoso a 60°C (temperatura a la que se puede observar la inactivación de la lipasa PS según lo reportado por el proveedor) y la actividad residual en el CLEA de lipasa luego de 50h a 60°C según metodología 3.3.7 para los CLEA del diseño central compuesto elaborados para la metodología de superficie de respuesta. En la Figura 4.6 se puede apreciar la estabilidad térmica de la suspensión del CLEA preparado a las condiciones óptimas entregadas por la superficie de respuesta.

Tabla 4.3 Estabilidad de los CLEAs del diseño central compuesto a las 50h y una temperatura de 60°C

CLEA				
pH	Razón enzima/albúmina (mg/mg)	Concentración glutaraldehído (mM)	Actividad residual de la suspensión (%)	Actividad residual en el CLEA (%)
2,8	10	25	56,8	24,5
4,5	5	15	65,8	37,8
		35	48,6	2,8
	15	15	40,9	20
		35	116	69,6
7	10	25	103,4	49,7
	10	25	99,6	46,8
	10	25	98,6	44,2
	10	25	100,7	47,3
	10	25	99,1	45,2
	10	25	101,2	48,9
	10	41,8	90,6	21
	10	8,2	40,8	8,6
	18,4	25	92,4	60,8
	1,6	25	95,1	39,8
9,5	5	15	61,7	40,9
		35	65,3	51
	15	15	65	32,7
		35	93,2	70,2
11,2	10	25	92,1	52

Al observar la Figura 4.5 se hace evidente que es posible el ascenso hacia el óptimo al incrementar la razón enzima/albúmina (lo que implica una disminución de la adición de albúmina en la preparación del CLEA de lipasa). Por esta razón se han preparado CLEAs de lipasa PS con altas razones enzima/albúmina (30 y sin la adición de albúmina). En la Tabla 4.4 se observa cómo esta disminución en el contenido de albúmina afecta la actividad de síntesis y su relación con la actividad de hidrólisis. Este ejercicio permite establecer que al aumentar la razón enzima más allá de valor óptimo, la actividad específica de síntesis disminuye, lo que puede deberse a que la albúmina ya no actúa como un espaciador entre moléculas de lipasa, lo que resultaría en un CLEA con mayores restricciones difusionales internas respecto a la actividad de síntesis (sustrato de mayor tamaño). Estos resultados ratificarían que el CLEA seleccionado para continuar el estudio sería el CLEA óptimo obtenido de la metodología de superficie de respuesta, sin embargo, se analizará la estabilidad térmica de los CLEAs de la Tabla 4.4 para evaluar el efecto del aumento de la razón enzima/albúmina sobre la actividad residual de la suspensión y la actividad residual en

el CLEA luego de 50h a 60°C (Tabla 4.5) (metodología 3.3.7).

Tabla 4.4 Actividades de hidrólisis y síntesis de CLEA a distintas razones enzima/albúmina. Los CLEA presentados han sido preparados con glutaraldehído a pH 11,2

CLEA		Actividad específica de hidrólisis (U _h /g _{CLEA})	Actividad específica de síntesis (U _s /g _{CLEA})
Razón enzima/albúmina (mg/mg)	Concentración glutaraldehído (mM)		
18,4	36,8	32,8	173,8
30,0	36,8	60,6	140,0
sin albúmina	36,8	206,2	77,3
sin albúmina	41,8	168,3	62,8

La Tabla 4.5 muestra que al ir aumentando la razón enzima/albúmina va disminuyendo tanto la actividad residual de la suspensión como la actividad residual en el CLEA, indicando que la disminución de la cantidad de albúmina en la preparación de CLEAs de lipasa PS va en desmedro de la estabilidad estructural del CLEA (entrecruzamiento deficiente).

Tabla 4.5 Actividades residuales de la suspensión de CLEA y actividad residual en el CLEA al ser sometido a inactivación térmica a 60°C por 50 h. Los CLEAs de lipasa PS presentan distintas razones enzima/albúmina y han sido preparados con glutaraldehído a pH 11,2

CLEA		Actividad residual de la suspensión (%)	Actividad residual en el CLEA (%)
Razón másica enzima/albúmina	Concentración glutaraldehído (mM)		
18,4	36,8	89,6	49,1
30	36,8	40,4	4,3
sin albúmina	36,8	27,3	1,9
sin albúmina	41,8	33,5	0,2

En la Figura 4.6 se muestran las cinéticas de inactivación térmica de CLEAs de lipasa PS, tomando como referencia la estabilidad de la lipasa PS sin inmovilizar (enzima soluble). La modelación de los datos experimentales se ha realizado mediante el uso del programa SPSS 8.0. Los resultados indican que el CLEA con G 36,8 y R 18,4 se ajusta a una inactivación de primer orden con actividad residual distinta de cero; los CLEA con G 36,8 y R 30 y CLEA con G 36,8 y sin adición de albúmina se ajustan a una inactivación bifásica con actividad residual

cero y el CLEA con G 41,8 y sin adición de albúmina junto con la lipasa PS sin inmovilizar se ajustan a una inactivación bifásica con actividad residual distinta de cero.

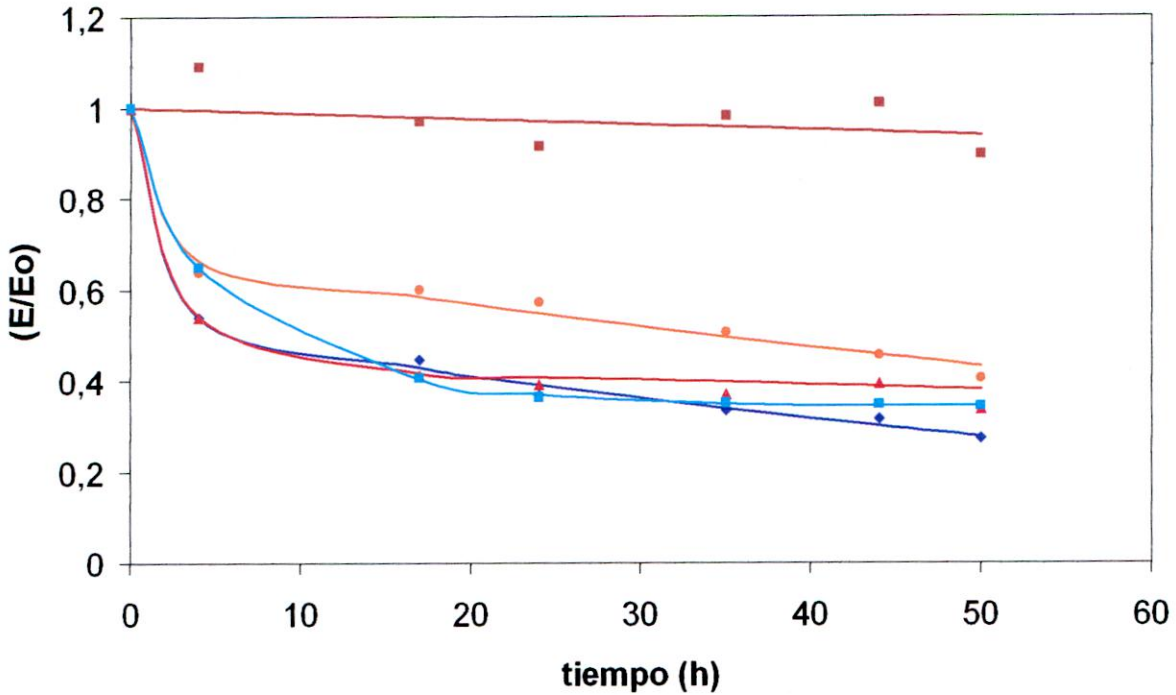


Figura 4.6 Inactivación térmica a 60°C de la suspensión de CLEAs preparado con glutaraldehído a pH 11,2 y distintos valores de R y G. Las líneas continuas indican la modelación de los datos experimentales y los puntos indican los datos experimentales. ■ : G 36,8mM y R 18,4mg/mg; ● : G 36,8mM y R 30mg/mg; ▲ : G 41,8mM y sin adición de albúmina; ◆ : G 36,8mM y sin adición de albúmina; ■ : lipasa PS sin inmovilizar (enzima en solución). E: es la actividad de hidrólisis de la suspensión del CLEA en medio acuoso a diferentes tiempos; Eo: es la actividad de hidrólisis del CLEA en medio acuoso a tiempo cero; E/Eo: representa la fracción de la actividad de hidrólisis de la suspensión a un tiempo determinado.

4.4 Evaluación del uso de dextrano aldehído (DPA) como agente de entrecruzamiento

Inicialmente se realizaron experiencias con el fin de encontrar la cantidad de agente de entrecruzamiento que debe ser utilizada para poder retener la mayor cantidad de actividad en el CLEA de lipasa PS. Se ha usado una solución inicial de DPA de 30 g/l como se menciona en la metodología 3.2.6. Cabe destacar que se han seleccionado tres concentraciones de dextrano aldehído y que concuerdan aproximadamente con las concentraciones de glutaraldehído respecto a la cantidad de moles de grupos aldehído ofrecidos por cantidad de moles de grupos amino presentes tanto en la albúmina como en la lipasa (ver Anexo 11).

A continuación, en la Figura 4.7 se muestra el efecto de la concentración de DPA en la suspensión de la preparación del CLEA sobre la actividad específica de síntesis del biocatalizador. En el gráfico se observa que la actividad de síntesis máxima del CLEA (183 U_s/g CLEA), se obtiene a una concentración de DPA de 2,2g/L. El rango de concentración de DPA en el cuál se logra un rango de actividades específicas de síntesis similares a las obtenidas con los CLEA preparados con glutaraldehído está entre 1,7 y 2,7 g/L (rango de concentraciones de DPA que aportan razones de grupos aldehído/grupos amino similares a las aportadas por los CLEA preparados con glutaraldehído, ver Anexo 11).

Debido a que la medición de la actividad de síntesis requiere de un medio y muestras relativamente anhidras, no se han podido cuantificar las actividades de síntesis de los sobrenadantes de la preparación de CLEAs con DPA, razón por la cuál se ha determinado solamente su actividad de hidrólisis; sin embargo, el perfil de actividad de hidrólisis del sobrenadante a distintas concentraciones de DPA, concuerda con el aumento de actividad de síntesis en el CLEA.

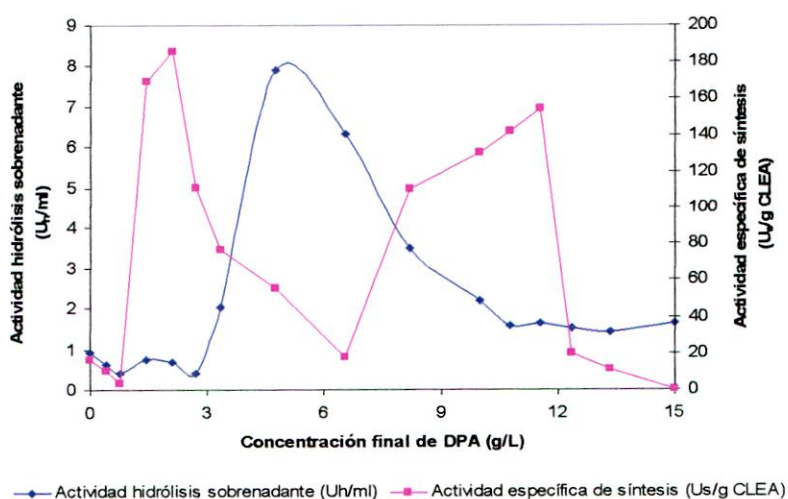


Figura 4.7 Selección de la concentración del agente de entrecruzamiento (DPA) en función de la actividad de síntesis del CLEA de lipasa resultante. Las experiencias se realizaron a partir de una solución de lipasa PS 50mg/mL en tampón fosfato 25mM pH 7,0 a una temperatura de 4°C.

En la Tabla 4.6 se puede apreciar la actividad de hidrólisis y el tamaño de partícula de los CLEA elaborados a distintas concentraciones de DPA y razones enzima/albúmina. El diseño de los experimentos se desarrolló tomando en cuenta tres concentraciones de DPA, donde 2,2g/L es el valor central y los extremos se calculan para permanecer en el rango de mayor actividad de síntesis mostrado en la Figura 4.7. Para cada una de estas concentraciones se pretende ver el efecto de utilizar una alta o una baja razón enzima/albúmina y como afectan estas variables en el tamaño de partícula y la actividad de hidrólisis del CLEA de lipasa.

Tabla 4.6 Actividad de hidrólisis y tamaño de partícula de CLEAs de lipasa PS entrecruzados con dextrano aldehído.

CLEA		Actividad de hidrólisis (U/g CLEA)	Tamaño de partícula (µm)
Razón enzima/albúmina (mg/mg)	Concentración dextrano aldehído (g/l)		
5	1,7	53,4	126,2 +/- 53,5
15	1,7	69,5	52,6 +/- 18,7
5	2,2	64,2	116,6 +/- 54,3
15	2,2	80	65,9 +/- 26,2
5	2,7	53,1	120,2 +/- 56,3
15	2,7	79,5	86,9 +/- 29,5

En la Tabla 4.7 se muestra el efecto de la concentración de DPA y la razón enzima/albúmina sobre la estabilidad térmica de la suspensión de CLEAs de lipasa y la retención de actividad en el CLEA (según metodología 3.3.7).

Tabla 4.7 Actividades residuales de la suspensión de CLEA y actividad residual en el CLEA al ser sometido a inactivación térmica a 60°C por 50 h. Los CLEAs de lipasa PS han sido preparados con dextrano aldehído como agente de entrecruzamiento

CLEA		Actividad residual de la suspensión (%)	Actividad residual en el CLEA (%)
Razón enzima/albúmina (mg/mg)	Concentración dextrano aldehído (g/l)		
5	1,7	121,5	37,6
15	1,7	98,6	47,4
5	2,2	82,9	25,4
15	2,2	109,1	31,3
5	2,7	72,5	36,4
15	2,7	56,1	9,9

Según los resultados de la Tabla 4.7, se puede determinar que al llevar a cabo el entrecruzamiento con dextrano aldehído se obtienen bajos porcentajes de retención de actividad en el CLEA luego de 50h a 60°C en medio acuoso en comparación con los logrados al utilizar glutaraldehído (Tabla 4.5).

Finalmente, según los resultados obtenidos con los CLEA preparados con glutaraldehído y con dextrano aldehído, podemos mencionar que aún cuando se logran actividades específicas de síntesis similares, las actividades residuales en los CLEA luego de ser sometidos a inactivación térmica presentan diferencias significativas. Al respecto, la máxima actividad residual de los CLEA preparados con dextrano aldehído es de 47,4% y la de los CLEA preparados con glutaraldehído es 70,2%. De acuerdo a estos resultados, se optó por continuar el estudio con el CLEA resultante de la optimización mediante superficie de respuesta (pH: 11,2; G: 36,8 y R: 18,4).

4.5 Determinación de las variables implicadas en la producción de biodiesel con CLEAs de lipasa a partir de aceite de raps canola

4.5.1 Caracterización del aceite de raps canola

Se ha caracterizado el aceite de raps canola utilizado en el presente estudio mediante la determinación del perfil de ácidos grasos (metodología 3.2.5). La Tabla 4.8 muestra que el perfil de ácidos grasos concuerda aproximadamente con el obtenido de bibliografía y mostrado en la Tabla 2.1. Este resultado permite la comparación de los resultados obtenidos con los resultados encontrados en otros trabajos que utilicen el mismo aceite. Al respecto, las diferencias podrían deberse a la sensibilidad de los métodos analítico utilizados.

Tabla 4.8 Perfil de ácidos grasos del aceite de raps canola refinado.

Ácidos Grasos	% del total de ácidos grasos	% del total de ácidos grasos ^(a)
C14	0,10	0
C16	4,94	3,5
C16:1	0,25	0
C18	1,54	0,9
C18:1	61,87	64,4
C18:2	19,58	22,3
C18:3	9,18	8,2
C20	0,62	0
C20:1	1,24	0
C22	0,31	0
C22:1	0,37	0

(a): Resultados reportados en Ma y Hanna, 1999.

De acuerdo al perfil de ácidos grasos del aceite se puede calcular el índice de yodo, el cual es uno de los parámetros que limita el uso de ciertos aceites para ser empleados para la producción de biodiesel. La norma europea EN 14214 determina tanto los parámetros que se deben considerar al caracterizar el biodiesel como los valores entre los que se deben encontrar dichos parámetros. Según dicha norma, el valor del índice de yodo no debe ser superior a 120, lo que limita el uso de aceites a aquellos cuyos ácidos grasos posean una baja cantidad de insaturaciones. Según lo anterior, se ha calculado el índice de yodo

considerando el perfil de ácidos grasos mostrado en la Tabla 4.8 (ver Anexo 12), obteniendo un valor de 112,1 considerando la caracterización realizada mediante metodología 3.2.5 y 114,9 considerando el perfil de ácidos grasos reportado por Ma y Hanna (1999), lo que permite que éste aceite sea utilizado en la producción de biodiesel.

4.5.2 Determinación del medio de reacción para la producción de biodiesel usando CLEA de lipasa PS

Para poder determinar el medio de reacción que será usado para las experiencias de producción de biodiesel, se ha realizado un diseño factorial de experimentos que considera cuatro variables (refinación del aceite, aceptor de acilo, uso de co-solvente y adición de agua) y dos niveles, lo que da un total de 16 experimentos. Cabe señalar que los niveles de tres de las cuatro variables son cualitativos (ver Tabla 3.6). Los experimentos han sido realizados en triplicado según la metodología experimental 3.3.10 usando como catalizador el CLEA de lipasa PS elaborado bajo las condiciones obtenidas de la optimización por metodología de superficie de respuesta.

A continuación se muestran los resultados de las cinéticas de producción de biodiesel dependiendo del alcohol usado para llevar a cabo la transesterificación de aceite de raps canola. La cuantificación del rendimiento de conversión es estimada restando al 100% teórico la suma del porcentaje de los acilglicéridos remanentes en el medio de reacción (valores con los cuales se elaboran las Figuras 4.8 y 4.9).

Se debe hacer notar que la mayoría de los trabajos que utilizan biocatalizadores para la producción de biodiesel trabajan con porcentajes en peso del biocatalizador respecto a la masa de aceite; sin embargo, en el presente trabajo se expresará este dato como razón enzima/sustrato (E/S) considerando que la enzima es la masa de CLEA de lipasa PS y el sustrato es la masa de aceite usado en la reacción.

Uso de metanol como aceptor de acilo

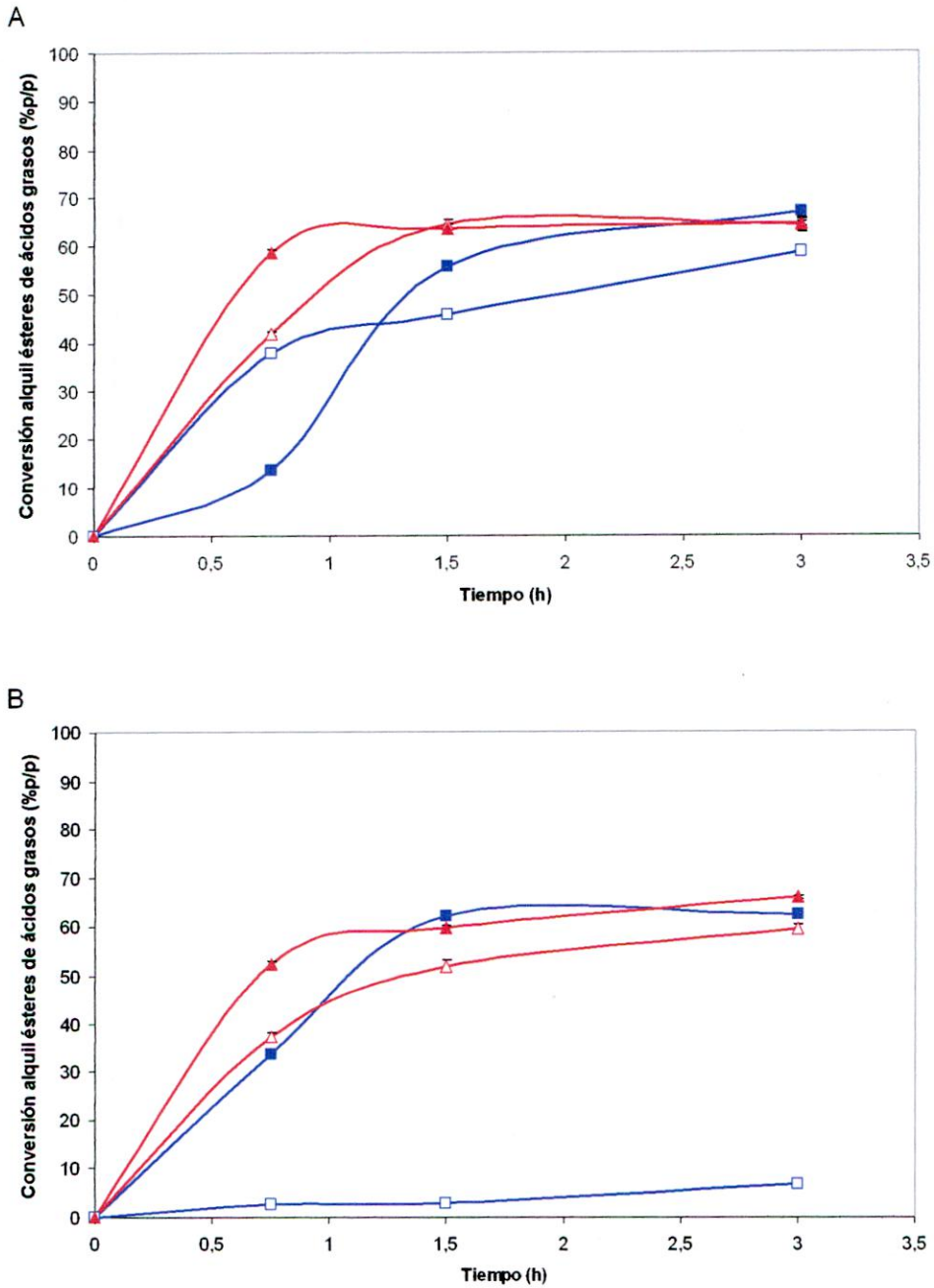


Figura 4.8 Cinética de producción de biodiesel a 40°C, una razón molar metanol/aceite de 4:1 y una razón E/S de 0,1. **A:** Uso de aceite de raps canola no refinado, **B:** Uso de aceite de raps canola refinado. Δ : Uso de *tert*-butanol como cosolvente (razón volumétrica 1:1 respecto al volumen de aceite) y sin agua en el medio de reacción. \blacktriangle : Uso de *tert*-butanol como cosolvente (razón volumétrica 1:1 respecto al volumen de aceite) y un 5%p/p de agua en el medio de reacción respecto a la masa de aceite. \square : Sin uso de co-solvente y con un 5%p/p de agua en el medio de reacción respecto a la masa de aceite. \blacksquare : Sin uso de co-solvente y sin adición de agua al medio de reacción.

Uso de etanol como aceptor de acilo

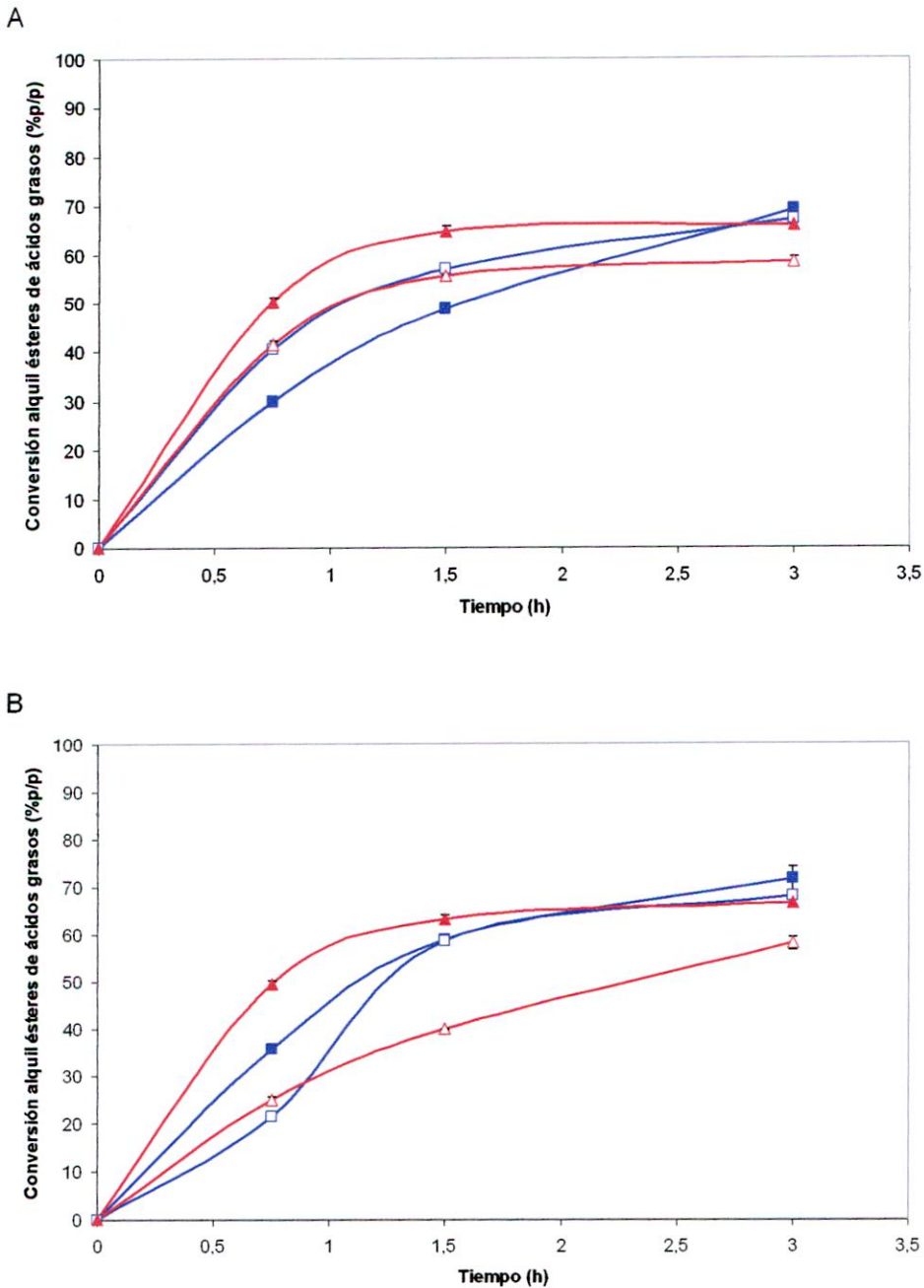


Figura 4.9 Cinética de producción de biodiesel a 40°C, una razón molar etanol/aceite de 4:1 y una razón E/S de 0,1. **A:** Uso de aceite de raps canola no refinado, **B:** Uso de aceite de raps canola refinado. Δ : Uso de *tert*-butanol como cosolvente (razón volumétrica 1:1 respecto al volumen de aceite) y sin agua en el medio de reacción. \blacktriangle : Uso de *tert*-butanol como cosolvente (razón volumétrica 1:1 respecto al volumen de aceite) y un 5%p/p de agua en el medio de reacción respecto a la masa de aceite. \square : Sin uso de co-solvente y con un 5%p/p de agua en el medio de reacción respecto a la masa de aceite. \blacksquare : Sin uso de co-solvente y sin adición de agua al medio de reacción.

Como se puede observar en las figuras 4.8 y 4.9, los valores máximos de conversión son similares. Para aclarar cual es la mejor condición para la producción de biodiesel usando el CLEA de lipasa PS seleccionado, se muestra la Tabla 4.9, donde aparece el valor del contenido de ácidos grasos libres en el punto final de la cinética (3h de reacción), con el cual se puede tener la cuantificación exacta de la conversión de biodiesel. El porcentaje de ácidos grasos del aceite refinado y no refinado al inicio de la reacción es de 0,89% y 1,77% respectivamente.

Para el cálculo de los rendimientos de conversión de alquil ésteres de ácidos grasos estimado y considerando el contenido de ácidos grasos libres, ver ejemplo en Anexo 5.

Tabla 4.9 Ácidos grasos libres y rendimiento de conversión de AEAG usando distintos medios de reacción. Las reacciones fueron llevadas a cabo a 40°C con una razón alcohol/aceite de 4:1 y una razón E/S de 0,1

Condiciones de reacción				Ácidos grasos libres (%p/p)	Conversión de AEAG (%p/p)
Alcohol	Aceite	Co-solvente	Agua (%)		
Metanol	No refinado	Ninguno	0	3,1	64,5
			5	13,7	44,3
		<i>tert</i> -butanol	0	4,4	58,8
			5	15,1	49,6
	Refinado	Ninguno	0	2,4	59,6
			5	4,3	1,9
		<i>tert</i> -butanol	0	5,6	53,4
			5	15,5	50,3
Etanol	No refinado	Ninguno	0	4,2	64,6
			5	8,9	57,7
		<i>tert</i> -butanol	0	4,9	52,8
			5	19,8	45,6
	Refinado	Ninguno	0	2,4	70,5
			5	16	51,6
		<i>tert</i> -butanol	0	6,1	51,2
			5	20,7	45,2

De acuerdo a los resultados obtenidos, en todos los casos se obtiene que el mayor rendimiento es obtenido sin uso de co-solvente y sin adición de agua al medio de reacción. Dentro de estos resultados el que presentó el mayor rendimiento de conversión de alquil ésteres de ácidos grasos fue la reacción en la que se utilizó etanol y aceite de raps refinado. Por lo tanto, se selecciona la mezcla de reacción compuesta de etanol y aceite de raps canola refinado para los siguientes experimentos.

4.5.3 Determinación de la temperatura de reacción y razón E/S empleado para la producción de biodiesel

Efecto de la temperatura en la cinética de producción de biodiesel

Se han realizado las reacciones según la metodología 3.2.13 a 30°C, 40°C y 50°C con el fin de determinar el efecto de la temperatura en el rendimiento de conversión máximo obtenido con el CLEA de lipasa PS seleccionado en el punto 4.3 según los valores óptimos de la metodología de superficie de respuesta. En la Figura 4.10 se muestran las cinéticas de producción de biodiesel a las distintas temperaturas mencionadas anteriormente, donde se puede apreciar que la mejor temperatura es 40°C.

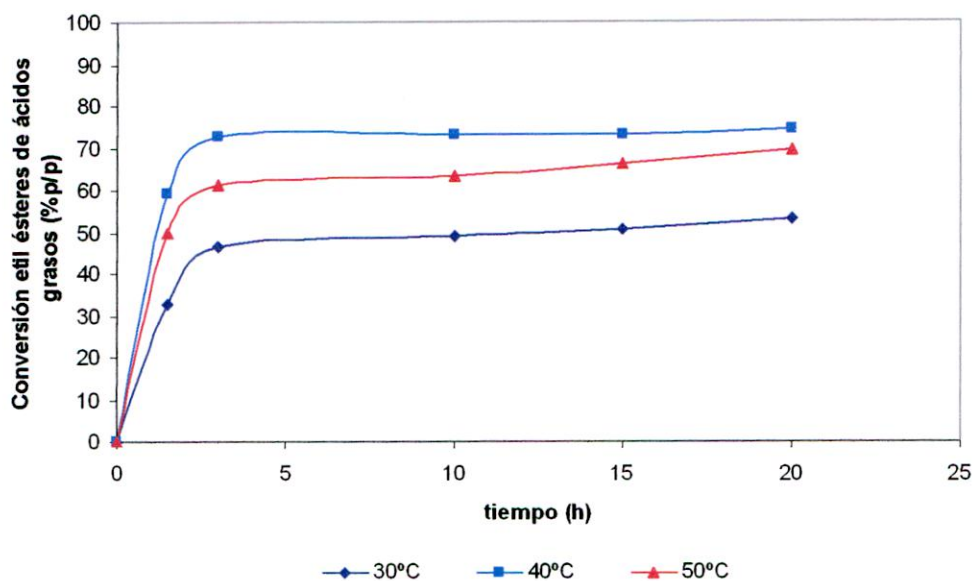


Figura 4.10 Efecto de la temperatura en la cinética de producción de biodiesel con una razón E/S de 0,1 y una razón molar etanol:aceite de 4:1

Efecto de la razón E/S en la cinética de producción de biodiesel

A continuación se muestra la Figura 4.11 donde se evalúa el efecto de la razón E/S sobre la cinética de producción de biodiesel. Se puede apreciar que a tiempos de 20h las conversiones comienzan a converger alrededor del 70%p/p, conversión que se alcanza a las 3h de reacción con una razón E/S de 0,1, mostrando una mayor velocidad de producción de biodiesel. Previo a estas experiencias se consideró el uso de razones E/S de 0,2, logrando

rendimientos de conversión de alquil ésteres de ácidos grasos de 77% luego de 20h de reacción, incremento de biocatalizador que no se justifica con el bajo incremento en el rendimiento de conversión.

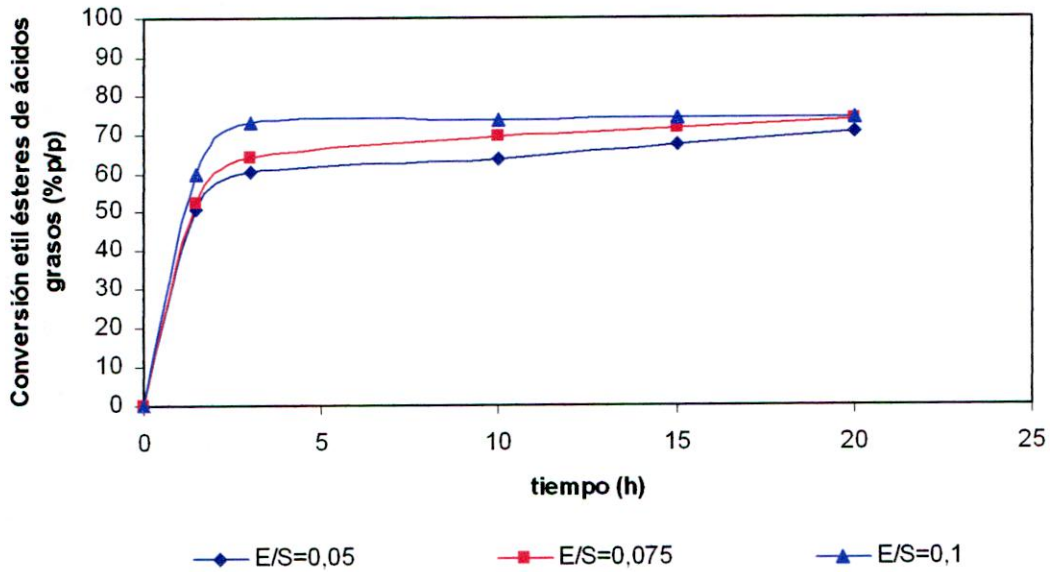


Figura 4.11 Cinéticas de producción de biodiesel a distintas razones E/S. Las reacciones se realizaron a una razón molar etanol:aceite de 4:1 y una temperatura de 40°C.

En la Figura 4.12 se muestra la cinética de producción de biodiesel (EEAG) y las cinéticas de producción y consumo de los acilglicéridos como intermediarios de la reacción usando una razón E/S de 0,1. Se observa un consumo rápido de los triglicéridos, por lo tanto una producción rápida de diglicéridos, los cuales también se consumen relativamente rápido hasta las 3h de reacción. El consumo de los diglicéridos produce monoglicéridos, los que se consumen muy lentamente a partir de las 3h.

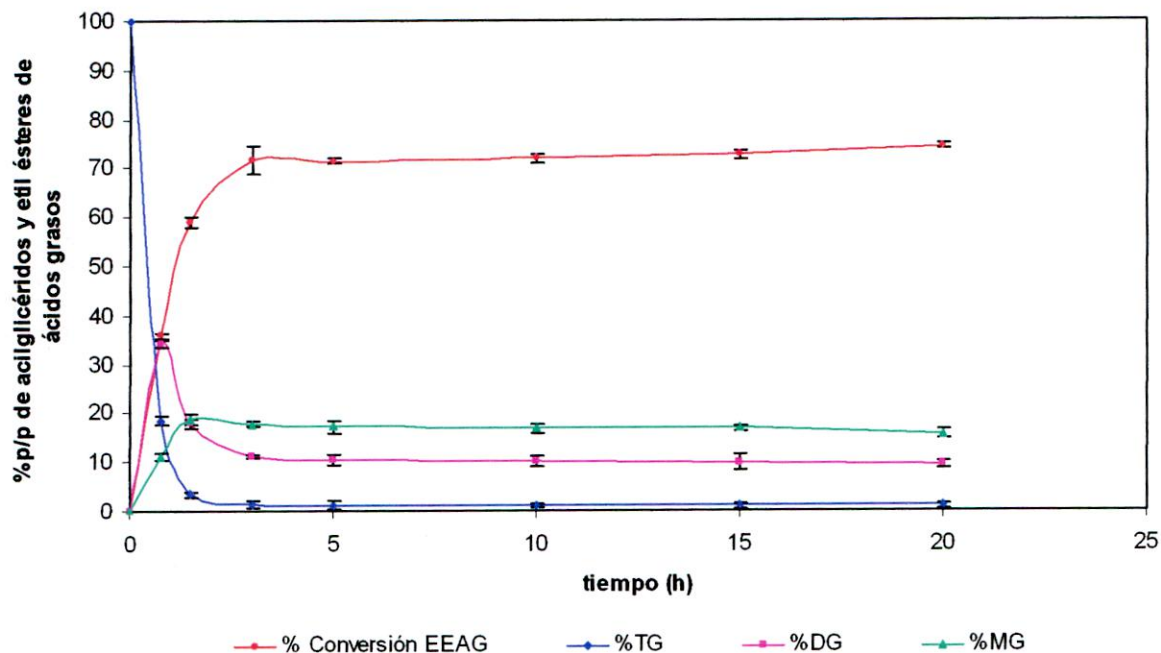


Figura 4.12 Cinéticas de producción de biodiesel y de producción y consumo de acilglicéridos a 40°C, razón etanol/aceite 4:1 y razón E/S 0,1. EEAG: etil ésteres de ácidos grasos. Los acilglicéridos son: triglicéridos (TG), diglicéridos (DG) monoglicéridos (MG).

4.6 Estrategias de aumento de la conversión de alquil ésteres de ácidos grasos de aceite de raps/canola

4.6.1 Adición de etanol en pasos sucesivos

Como se explicó en el capítulo 2, la adición de etanol en pasos sucesivos al medio de reacción evitaría su efecto negativo sobre la producción de biodiesel. Debido a que no se ha logrado obtener rendimientos de conversión superiores a 73% (p/p), se ha intentado la estrategia de la adición sucesiva de 1 equivalente molar de alcohol respecto a los triglicéridos hasta completar la razón estequiométrica de 3 equivalentes molares por cada equivalente molar de triglicérido. La Figura 4.13 muestra la cinética de producción de biodiesel utilizando la estrategia anteriormente mencionada. Se agrega un equivalente molar de etanol a tiempo 0h y luego de alcanzar un rendimiento cercano a 33% p/p (rendimiento teórico máximo para cada equivalente molar de alcohol) se adiciona el siguiente equivalente

molar, con el que teóricamente se alcanzaría una conversión de 66% p/p, lo que se observa a los 150 minutos de reacción. Al adicionar el último equivalente molar se espera obtener un rendimiento cercano al 100% p/p, sin embargo, se obtienen valores cercanos a los obtenidos en el punto 4.5.3, lo que indica que la detención de la producción de biodiesel no es producto del efecto negativo del alcohol sobre el biocatalizador. Cabe mencionar que luego de 20h se cuantificó el rendimiento de conversión y éste permaneció en 74% p/p.

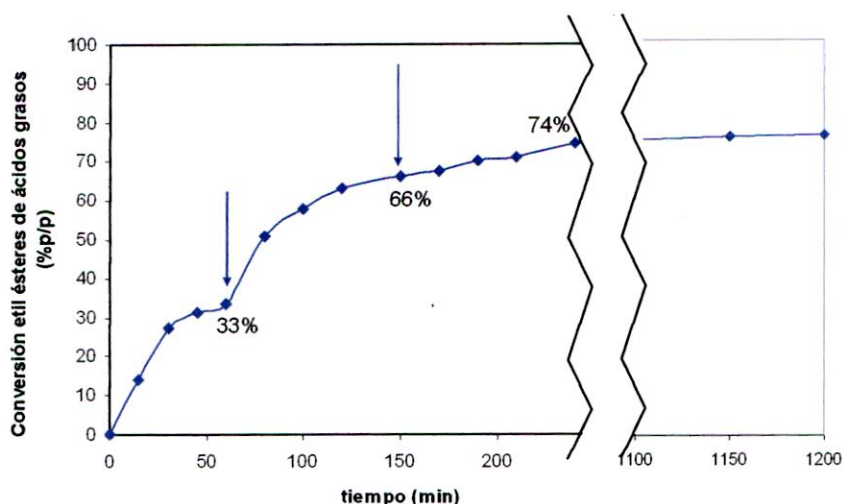


Figura 4.13 Adición de etanol en pasos sucesivos al medio de reacción. Se agrega el primer equivalente molar de etanol a tiempo cero. Las flechas indican la adición de un equivalente molar de etanol al medio de reacción. Reacción a 40°C y razón E/S de 0,1.

4.6.2 Adición de sílica gel al medio de reacción

Un factor negativo que pueda estar deteniendo la reacción sería el depósito del glicerol sobre la superficie del biocatalizador provocando limitaciones de transferencia de masa para que los acilglicéridos accedan al sitio activo de la lipasa. En la Tabla 4.10 se muestra el efecto de la adición de sílica gel al medio de reacción en la máxima conversión de EEAG. Según los resultados se ha observado un aumento de la conversión de EEAG al aumentar la cantidad de sílica gel agregada al medio de reacción.

Tabla 4.10 Efecto de la adición de sílica gel al inicio de la reacción sobre el rendimiento de conversión de biodiesel. Las reacciones se realizaron a una temperatura de 40°C, una razón molar etanol/aceite de 4:1, una razón E/S de 0,1 y un tiempo de reacción de 20h

Sílica gel (%p/p)	Conversión EEAG (%p/p)
0	74,3
10	81,7
20	89,4
34,2	91,3

Según los resultados de la Tabla 4.10 se han realizado las cinéticas de producción de biodiesel mostrada en la Figura 4.14 utilizando un 20%p/p de sílica gel en el medio de reacción a distintas razones E/S para determinar el efecto que tiene la disminución de la cantidad de CLEA en el medio de reacción en presencia de sílica gel.

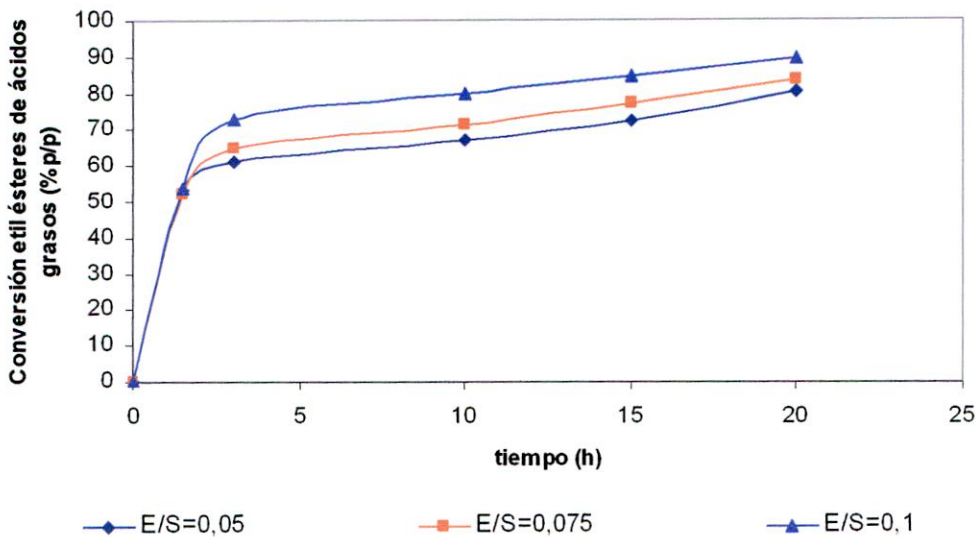


Figura 4.14 Cinéticas de producción de biodiesel a distintas razones E/S. Las reacciones se realizaron a una razón molar etanol:aceite de 4:1, una temperatura de 40°C y una cantidad de sílica gel de 20% respecto a la masa de aceite.

4.6.3 Lavados del CLEA de lipasa PS previo a su reutilización

En la Figura 4.15 se muestra el efecto del lavado del biocatalizador sobre la conversión de EEAG. Se realizan experiencias de producción de biodiesel con CLEA de lipasa y con CLEA

de lipasa PS adicionando 10% de sílica gel. Para cada caso se realiza un duplicado y se mide la conversión de EEAG a las 20h de reacción. Luego de terminar las reacciones se usa uno de los duplicados para iniciar otra reacción a 20h (con el CLEA de lipasa PS o con la mezcla de sílica gel y CLEA de lipasa PS usados en la primera reacción) y el otro duplicado para lavar el CLEA (o CLEA+10% de sílica gel) con *tert*-butanol y posteriormente usarlo en una segunda reacción a 20h. Se puede apreciar que si bien se logra una conversión mayor al usar sílica gel en la primera reacción, en la segunda (con o sin lavado del CLEA) la conversión es menor en el caso en que se utiliza el CLEA de lipasa PS con la adición de sílica gel.

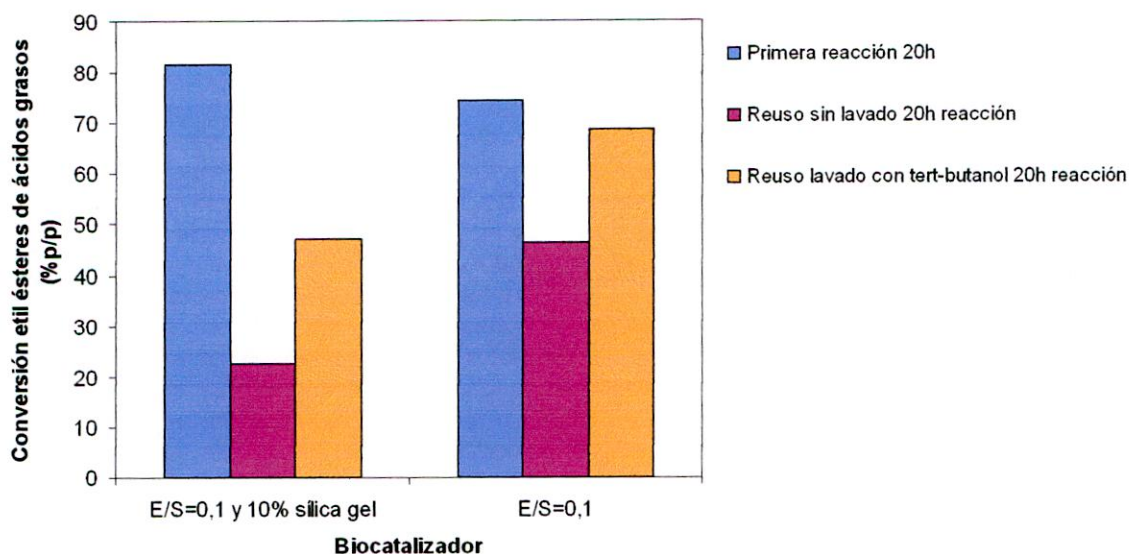


Figura 4.15 Evaluación de la reutilización de biocatalizadores lavados con *tert*-butanol. Reacciones realizadas a 40°C, razón molar etanol:aceite de 4:1.

Como se puede observar en la Figura 4.15, el uso de sílica gel en el medio de reacción logra aumentar el rendimiento de conversión en el primer lote de reacción; sin embargo, no es útil al intentar realizar un segundo lote de reacción, lo que no posibilita su uso en procesos a nivel industrial, en los que es deseable la reutilización del biocatalizador.

4.6.4 Elaboración de CLEAs de lipasa con superficie hidrofóbica

Con el propósito de mejorar el rendimiento de conversión de biodiesel se ha abordado la estrategia de producir CLEA de lipasa PS con superficie hidrofóbica para evitar que el

glicerol generado como subproducto de la reacción se deposite en la superficie del biocatalizador. Para tal efecto se han empleado cuatro alcoxisilanos (compuestos usados para generar la hidrofobización de superficies) y tres agentes de entrecruzamiento (diaminas) según lo establecido en la metodología 3.3.7. Los CLEAs han sido evaluados respecto a su conversión de EEAG, actividad de síntesis, contenido de proteína y tamaño de partícula.

En la Tabla 4.11 se muestran los valores de actividad específica de síntesis, contenido de proteína en los CLEAs y tamaño de partícula. Además se han calculado los rendimientos de inmovilización de cada CLEA considerando la masa ($RI_m = (\text{masa CLEA final} / \text{masa inicial de lipasa PS comercial}) * 100$) y considerando la actividad de síntesis ($RI_a = (\text{actividad de síntesis CLEA final} / \text{actividad inicial de síntesis de la lipasa PS comercial}) * 100$).

Tabla 4.11 Caracterización de CLEAs de lipasa PS con superficie hidrofóbica.

CLEA hidrofóbico		Actividad síntesis (U _S /g _{CLEA})	Proteína en CLEA (%)	RI _m (%)	RI _a (%)	Tamaño partícula (μm)
Agente entrecruzamiento	Alcoxisilano					
MXDA	TMPS	147,8	24,8	46,7	108,4	51,5±12,9
	TES	27,5	11	206,5	87,9	65,5±20,1
	PTES	131,1	20,4	49,4	100,4	63,4±18,5
	TMMS	70,2	14,4	113,9	123,9	55,5±13,6
HMDA	TMPS	97,2	21,7	48	72,3	54,9±12,5
	TES	37,6	12,7	124,3	72,4	38,2±9,8
	PTES	113,5	24,9	48,1	84,7	58,2±20,9
	TMMS	183,5	13,9	109,4	311,2	52,4±15,5
DAHP	TMPS	58	19,2	46	41,3	55,3±12,9
	TES	471,8	14,9	74,8	546,8	44±17,2
	PTES	106,5	30,7	14,1	23,3	55,8±18,7
	TMMS	39,2	11,9	83,6	50,7	71,4±20,6

Los CLEAs con los que se obtienen los mayores rendimientos de conversión (CLEA HMDA PTES y CLEA DAHP PTES) en la Table 4.12, presentan un comportamiento muy diferente en cuanto a sus rendimientos de inmovilización (RI_m y RI_a) de la Tabla 4.11, siendo el CLEA DAHP PTES el que muestra rendimientos comparativamente bajos respecto al CLEA HMDA PTES, por lo que se seleccionará este último para realizar una cinética de producción de biodiesel.

En la Tabla 4.12 se muestra el rendimiento de conversión y el contenido final de acilglicéridos obtenido luego de 20h de reacción a 40°C y 10% de CLEA de lipasa PS hidrofobizado con las diferentes combinaciones entre agente de entrecruzamiento y alcoxisilano.

Tabla 4.12 Efecto del agente de entrecruzamiento y adición de alcoxisilanos en el rendimiento de conversión de EEAG y acilglicéridos (TG, DG y MG) remanentes en la mezcla luego de 20h de reacción

CLEA hidrofóbico		MG (%p/p)	DG (%p/p)	TG (%p/p)	Rendimiento Conversión EEAG (%p/p)
Agente de entrecruzamiento	Alcoxisilano				
MXDA	TMPS	9,1±0,3	6,4±0,4	1,4±0,1	83,1±0,6
	TES	12±0,4	11,1±0,1	3,7±0,7	73,2±0,4
	PTES	11±1,1	6±1	1±0,3	82±0,2
	TMMS	12,5±0,1	7,5±0,1	1,1±0,1	79±0,1
HMDA	TMPS	3±0,3	3,5±0,1	1,3±0,2	92,2±0,4
	TES	10,8±0,9	16,2±0,1	7±1	66±0,2
	PTES	0,8±0,3	1,8±0,3	0,6±0,2	96,8±0,5
	TMMS	13,6±0,1	8,7±1,3	1,9±0,1	75,7±0,1
DAHP	TMPS	2,7±0,1	3,4±0,3	1,4±0,1	92,5±0,6
	TES	5,2±0,1	4,5±0,3	1,7±0,1	88,7±0,4
	PTES	0,6±0,2	0,9±0,1	1,2±0,1	97,4±0,3
	TMMS	4,4±0,2	4,7±0,1	1,9±0,1	89,2±0,4

Como se puede observar, se han logrado rendimientos de conversión de aproximadamente 97% p/p, implicando un gran avance en la aplicación de biocatalizadores en la producción de biodiesel.

Según la metodología 3.3.7 para preparar CLEAs hidrofóbicos, se debe oxidar la enzima para generar grupos aldehídos en la superficie de la enzima, lo que le permitiría entrecruzarse con los grupos amino de los agentes de entrecruzamiento. En la Figura 4.16 se muestra la carga de grupos aldehído en la superficie de la lipasa de *B. cepacia* al ser oxidada. Se ha tomado en cuenta la oxidación de los grupos hidroxilo de las cadenas laterales de serina, treonina y tirosina. La cantidad de estos residuos en la lipasa es un total de 70, que es 10 veces mayor a la cantidad de residuos de lisina empleados para entrecruzarse en el caso de la utilización de glutaraldehído como agente de entrecruzamiento. Esto permitiría la preparación del CLEA sin la adición de albúmina, lo que podrá ser contrastado según los resultados de la Tabla 4.13 y discutido en el punto 5.7.

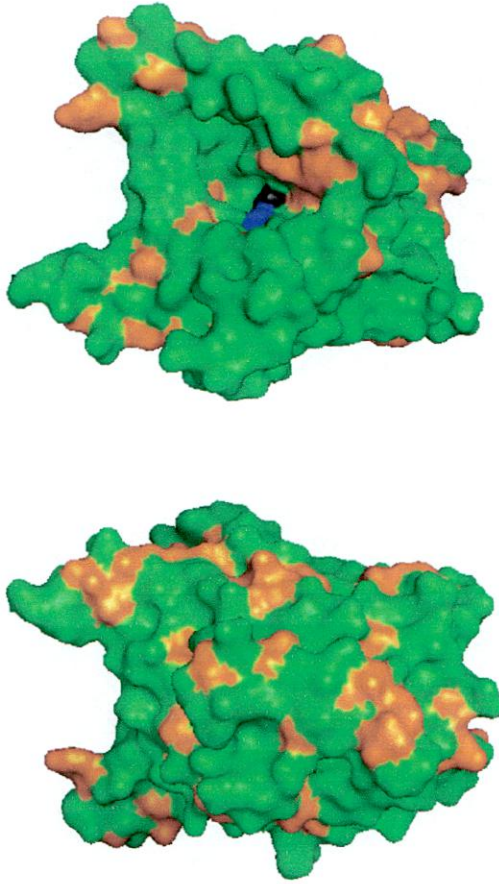


Figura 4.16 Superficie de lipasa de *Burkholderia cepacia* mostrando los residuos de treonina, tirosina y serina (en color naranja) cuyas cadenas laterales poseen grupos hidroxilo que pueden ser oxidados a aldehídos. En azul se destacan los residuos del sitio activo (Serina 87, Ácido aspártico 264, Histidina 286) y en negro se destaca la serina 87 que es parte de los residuos del sitio activo (Lang *et al.*, 1998) y simultáneamente uno de los residuos que se oxidan.

Como se mencionó anteriormente, el CLEA PTES HMDA se ha seleccionado para realizar la cinética de producción de biodiesel (Figura 4.17), donde se puede apreciar que se obtiene una conversión máxima a un tiempo cercano a 20h. Además, se puede observar que utilizando el CLEA con superficie hidrofóbica, se pueden seguir transesterificando los intermediarios de la reacción, lo que no ocurre al usar el CLEA seleccionado en el punto 4.3, como se muestra en la Figura 4.12.

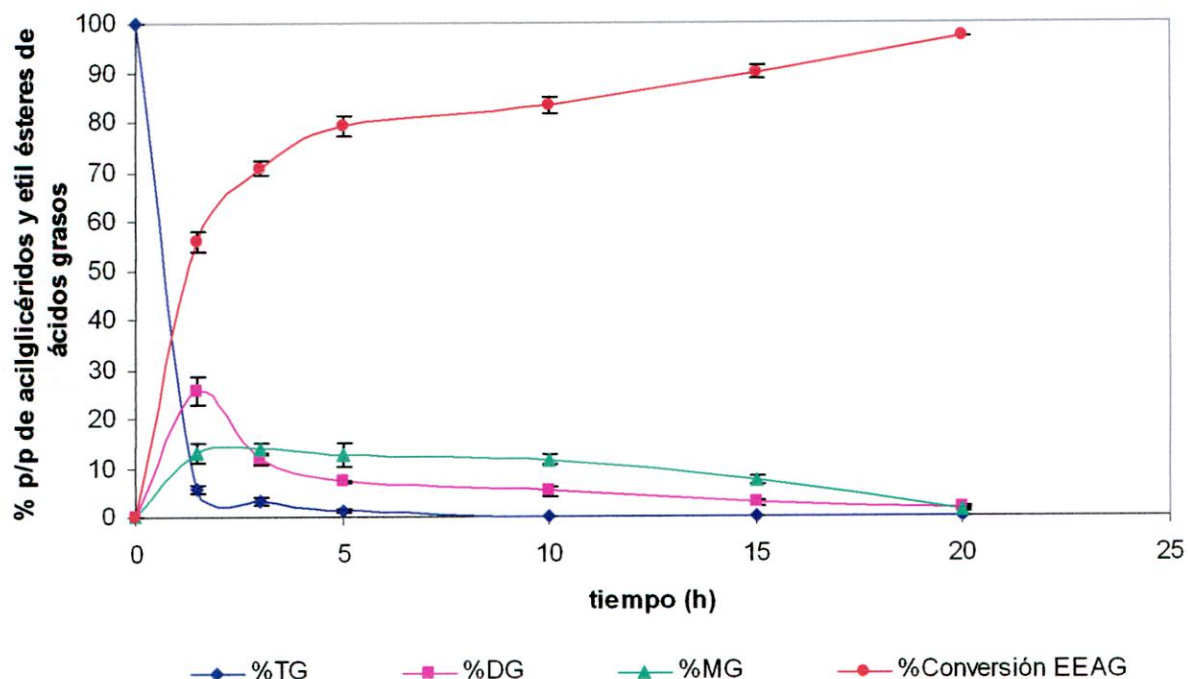


Figura 4.17 Cinéticas de producción de biodiesel y de producción y consumo de acilglicerol a 40°C, una razón E/S de 0,1 con CLEA PTES-HMDA y una razón etanol:aceite de 4:1. EEAG: etil ésteres de ácidos grasos. Acilglicéridos: triglicéridos (TG), diglicéridos (DG) y monoglicéridos (MG).

En la Tabla 4.13 se muestran los cambios del CLEA PTES HMDA en términos de masa, contenido de proteína y actividad específica de síntesis durante el transcurso de la reacción. Estos datos entregan un indicio de lo que estaría ocurriendo con el CLEA tanto en la etapa inicial de la reacción (entre 0h a 5h) como en la parte de la cinética que se comporta como una recta (entre 5h y 20h como se muestra en la Figura 4.17). El CLEA PTES HMDA contiene un 24,9% de proteína inicialmente, lo que representa el 100% al inicio de la reacción. Respecto a la masa de CLEA, se puede observar que el CLEA se comienza a solubilizar en el medio de reacción, lo que se observa en la disminución progresiva del porcentaje relativo de CLEA en el medio de reacción; sin embargo, entre las 0 y 5 h no existe una gran disminución en el porcentaje relativo de proteína en el CLEA, lo que quiere decir que la mayoría de la masa de CLEA perdida en este rango de tiempo no es proteína, la que se empieza a concentrar en el CLEA resultando en un aumento de la actividad específica de síntesis. Entre las 5 y las 20 h se puede observar una pérdida tanto de la masa de CLEA como de la proteína, lo que se traduce en una pérdida de actividad específica de síntesis. La

posibles implicaciones de los resultados correspondientes a la Figura 4.17 y la Tabla 4.13 se explicarán en profundidad en la sección 5.7.

Por otra parte, se ha cuantificado la estabilidad térmica a 60°C (actividad residual de la suspensión y la actividad residual en el CLEA PTES HMDA en medio acuoso) en forma análoga a los datos mostrados en las tablas 4.3, 4.5 y 4.7, obteniendo 66,7% de la actividad de la suspensión luego de 50h y un porcentaje de actividad en el CLEA de 62,7% luego de 50h.

Tabla 4.13 Caracterización del CLEA PTES HMDA durante la reacción de transesterificación

Tiempo de reacción (h)	Porcentaje relativo de CLEA en el medio de reacción (%)	Porcentaje relativo de proteína en CLEA (%)	Actividad síntesis (U _S /g _{CLEA})
0	100	100	117,3
1,5	79,6	99,6	128,7
3	73,9	98,8	140
5	70,3	96,8	143,4
10	69,8	83,5	99,9
15	61,4	74,3	77,2
20	51,1	65,5	56,5

Por otra parte, al recuperar la masa final de CLEA mediante centrifugación, lavarla con acetona y reutilizarla en la misma cantidad de aceite usado en la primera reacción (lo que representa el uso de CLEA PTES HMDA a una razón E/S de 0,051), se obtuvo un rendimiento de conversión de 94,5%p/p luego de 20h de reacción. La acción se repitió una vez más y se obtuvo casi la totalidad de la masa de CLEA, la que fue lavada con acetona y fue reutilizada nuevamente, consiguiendo un rendimiento de conversión de 93,2%p/p. Lo anterior deja en evidencia que es posible la reutilización del CLEA PTES HMDA, con lo que se presenta una nueva ventaja para su aplicación en la producción de biodiesel.

5 Discusión

5.1 Selección de lipasa para su uso en la producción de biodiesel

Según los resultados del punto 4.1 se ha determinado que las lipasas del género *Burkholderia* (*B. cepacia* y *B. fluorescens*) poseen las mayores actividades de síntesis. En otros estudios (Salis *et al.*, 2008) se analizaron ocho lipasas comerciales distintas, las que fueron inmovilizadas en un soporte macroporoso de polipropileno. Dentro de las lipasas utilizadas se encuentran las estudiadas en el presente trabajo, y se ha llegado a la conclusión de que las lipasas provenientes del género *Burkholderia* (*B. fluorescens* y *B. cepacia*) son las que obtienen mayor rendimiento de conversión de metil ésteres de ácidos grasos en medio libre de co-solvente. Por otra parte, las lipasas de *Rhizopus oryzae*, *Candida rugosa*, *Mucor javanicus*, *Penicillium roqueforti*, *Aspergillus niger*, *Penicillium camembertii* inmovilizadas en el soporte de polipropileno, mostraron ser incapaces de catalizar la síntesis de biodiesel, lo que concuerda con los bajos valores de actividad de síntesis obtenidos con algunas de estas lipasas mostradas en la Tabla 4.1.

Además, la lipasa de *R. oryzae* es sn-1(3) regioselectiva (Scheib *et al.*, 1998), y debido a que el sustrato usado para la medición de actividad de síntesis es solamente un ácido graso unido a pNP, la actividad de síntesis de ésta lipasa es cercana a cero, por lo que el método usado en la presente tesis no sería útil para evaluar lipasas regioselectivas. Sin embargo, los resultados de Salis *et al.* (2008) concuerdan con los de actividad de síntesis (Tabla 4.1), por lo que se muestra como un método rápido y válido para la selección de lipasas inespecíficas destinadas a su uso como biocatalizador en la reacción de transesterificación de aceites para la producción de biodiesel.

Por otra parte, se ha analizado también la estabilidad de las lipasas en un medio no reactivo pero análogo al medio de reacción (presencia de metanol y en un solvente como hexano anhidro) como se muestra en el punto 4.1. En la Tabla 4.1 las lipasas de *Candida rugosa*, *Mucor javanicus*, *Candida sp./Rhizopus sp.*, *Mezcla lipasas de hongos*, *Burkholderia fluorescens* y *Rhizopus oryzae* mostraron tiempos de vida media muy bajos respecto a los de las lipasas de *B. cepacia*. Estos resultados son coincidentes con otros estudios al respecto, donde esta lipasa ha mostrado ser estable frente a una amplia gama de solventes orgánicos

y además posee una alta estabilidad térmica (Sugihara *et al.*, 1992). Por otra parte también existen estudios que muestran que la lipasa mencionada posee alta tolerancia a la presencia de metanol (Kaieda *et al.*, 2001). Finalmente, entre la lipasa PS y SL, se ha seleccionado la lipasa PS ya que muestra mayor actividad específica de síntesis y mayor estabilidad en presencia de metanol, perdiendo solamente un 10% de su actividad de síntesis inicial luego de 24 h.

5.2 Determinación de las condiciones iniciales de elaboración de CLEAs previo a la optimización de la actividad de síntesis

Se han identificado los residuos de lisina en la superficie de la lipasa (según la secuencia aminoacídica reportada en Pubmed) y los aminoácidos pertenecientes al sitio activo de la lipasa de *B. cepacia* (Lang *et al.*, 1998) como se muestra en la Figura 4.1. Esta información permite tener en cuenta por qué sectores se llevará a cabo el entrecruzamiento, el que en el presente caso no interferiría con el sitio activo de la lipasa, puesto que la mayor parte de los residuos de lisina se encuentran en el lado opuesto al sitio catalítico. Por otra parte, debido a que la lipasa de *B. cepacia* posee una baja cantidad de lisinas capaces de entrecruzarse con glutaraldehído, se hace necesaria la adición de albúmina a la preparación de CLEAs de esta enzima.

Respecto a la selección del agente precipitante, al observar la Figura 4.3, se puede mencionar que es necesaria una menor cantidad de sulfato de amonio (saturado al 60%) y acetona para comenzar la precipitación de la lipasa desde la solución enzimática respecto a las cantidades de *tert*-butanol y polietilenglicol 600. Por otra parte, con la Figura 4.4 se pueden determinar los rendimientos de inmovilización tomando en cuenta tanto la actividad de hidrólisis como la de síntesis. Lo anterior permite determinar que no existe relación directamente proporcional entre ambas actividades, siendo necesario considerar la reacción en la cual será utilizado el biocatalizador. En el presente estudio los CLEAs de lipasa PS serán empleados en una reacción de síntesis (transesterificación de aceite de raps con un alcohol). Según los resultados, se puede apreciar que la acetona es la que muestra el mayor rendimiento de inmovilización tomando en cuenta la actividad de síntesis, por el contrario, con el uso del mismo agente precipitante se obtiene el menor rendimiento de inmovilización tomando en cuenta la actividad de hidrólisis. Si se analiza, éste es el mejor resultado debido

a que con el uso de acetona en la precipitación se obtiene un CLEA de lipasa PS que privilegia la transesterificación por sobre la hidrólisis. Si se observan los valores de rendimiento de inmovilización considerando actividad de síntesis, los casos en los que se usan solventes orgánicos como *tert*-butanol y acetona, muestran una hiperactivación (rendimientos de inmovilización mayores al 100%), lo que se había observado anteriormente en otros trabajos que utilizan lipasas en función de la actividad de hidrólisis (Palomo *et al.*, 2002; Hara *et al.*, 2008; López-Serrano *et al.*, 2002). En el presente trabajo se muestra el efecto de hiperactivación en relación a la actividad de síntesis, lo que no se había mostrado en trabajos anteriores. Las posibles explicaciones para este comportamiento son que los agentes precipitantes provocarían distintos cambios conformacionales en las lipasas y que la humedad de los CLEAs hace que los biocatalizadores que poseen mayor cantidad de agua privilegien la reacción de hidrólisis por sobre la de síntesis, lo que se reflejaría en que los CLEA preparados con acetona sean los que muestran mayor hiperactivación respecto a la síntesis. Por otra parte, el hecho de no encontrar una proporcionalidad entre actividad de síntesis y de hidrólisis se puede deber a la utilización de sustratos diferentes para la cuantificación de ambas actividades.

5.3 Optimización de la actividad de transesterificación de CLEAs de lipasa PS entrecruzado con glutaraldehído

En la Tabla 4.2 se mostró el diseño central compuesto y los datos de actividad específica de síntesis usados para la metodología de superficie de respuesta. Se ha encontrado un máximo de actividad de síntesis de $163,3U_s/g_{CLEA}$ según el modelo y un valor experimental de $173,8U_s/g_{CLEA}$ a las condiciones óptimas entregadas por la superficie de respuesta. Esto indica solo un 6,4% de diferencia entre la predicción del modelo y el valor real.

Según la Figura 4.5 se podría seguir aumentando R pero de acuerdo a los datos de la Tabla 4.4 al aumentar R a valores mayores al óptimo, la actividad específica de síntesis empieza a disminuir. Los valores de R varían al cambiar la cantidad de albúmina en el CLEA manteniendo la cantidad de la preparación en polvo de lipasa comercial constante. De esta forma, para ir aumentando R, se va disminuyendo la cantidad de albúmina en el CLEA. Para R bajas se aprecian menores actividades de síntesis probablemente debido a que dentro de

la misma masa de CLEA es mayor la proporción de albúmina que de lipasa. Según este análisis al ir aumentando R aumentaría la actividad de síntesis, pero al llegar al óptimo comienza a disminuir la actividad de síntesis, lo que podría deberse a que al ir disminuyendo la albúmina en el CLEA (la que podría servir de espaciador entre las macromoléculas de lipasa para permitir que ingrese el sustrato en la macroestructura del CLEA), éstos podrían verse compactados, lo que impediría la expresión de mayor potencial catalítico. Sin embargo, según el análisis de ANOVA (Anexo 10) se obtiene que si bien el modelo entregado por la superficie de respuesta es significativo y se ajusta a los datos experimentales, la variable que no influye significativamente en el modelo considerando un nivel de confianza de 95% es R. Esto se puede apreciar también en la Ec. 4.3 que describe la superficie de respuesta, donde al comparar los coeficientes de las variables pH, G y R, se observa que el coeficiente de la variable R es el menor de los tres, lo que tiene relación con la influencia de la variable en la actividad de síntesis del CLEA de lipasa.

Por otra parte, se sabe que la albúmina se encuentra aportando grupos amino provenientes de los residuos de lisina necesarios para mejorar el entrecruzamiento de los agregados enzimáticos. El aumento de R podría dar como resultado CLEAs de lipasa con un entrecruzamiento deficiente o nulo (lo que se puede observar indirectamente a través de la estabilidad térmica de los CLEA de la Figura 4.6). Al respecto, se sabe que la intensidad de la interacción de la enzima con el soporte (que en el caso de los CLEA al no existir soporte estarían dadas por las interacciones de los agregados enzimáticos con el agente de entrecruzamiento) sería directamente proporcional a la estabilidad térmica en medio acuoso (Pedroche *et al.*, 2007). De esta forma, se ha evaluado la estabilidad de la suspensión de CLEA y la actividad residual en el CLEA luego de una experiencia de estabilidad térmica llevada a cabo según la metodología 3.3.7 (ver ejemplo de cálculo en Anexo 8). Como se observa en la Tabla 4.5, al aumentar R manteniendo constante G, la actividad de hidrólisis de la suspensión de CLEA sometida a estabilidad térmica va disminuyendo al igual que la actividad residual en el CLEA, lo que indica la importancia de la adición de albúmina para el entrecruzamiento de la lipasa PS. En la Figura 4.6 se pueden apreciar las cinéticas de inactivación térmica de los CLEA mencionados anteriormente, dejando en evidencia que mientras mayor sea R la cinética se acerca más a la estabilidad de la enzima libre, y por el contrario al usar el valor óptimo de R se muestra una estabilidad cercana al 90%, esto concuerda con los resultados mostrados por Pedroche *et al.* (2007) usando enzima inmovilizadas en soportes.

Debido a las razones anteriormente expuestas, se optó por seleccionar el CLEA preparado a las condiciones óptimas entregadas por la metodología de superficie de respuesta, el que fue evaluado en la transesterificación de aceite de raps canola para la producción de biodiesel.

Por otra parte, según el análisis de ANOVA respecto a los datos de la Tabla 4.2 y mostrado en el Anexo 10, el modelo no es significativo respecto a la actividad de hidrólisis, sin embargo, la variable que más influye en la actividad de hidrólisis es G, particularmente G^2 . En general, mientras mayor sea G, menor es la actividad de hidrólisis, pero esto también dependerá del pH del glutaraldehído, lo que determinaría el tamaño del agente de entrecruzamiento. Sin embargo, como el modelo no es significativo para esta respuesta, no se puede concluir claramente la incidencia de una u otra variable sobre la actividad de hidrólisis.

En cuanto al tamaño de partícula, según el Anexo 10 se puede mencionar que el modelo es significativo y que de las variables estudiadas tanto pH como R son significativos. Debido a que a pH 4,5 las especies que predominaría serían los hemiacetales cíclicos y monómeros de glutaraldehído, el hecho de aumentar el valor de R no tendría mucho efecto en el tamaño de partícula, produciéndose finalmente CLEAs de pequeño tamaño. Al trabajar con glutaraldehído a pH 9,5 se privilegiaría la formación de polímeros (ver Anexo 8), observándose los mayores tamaños de partícula, lo que dependerá también de la cantidad de albúmina disponible para ser entrecruzada.

Respecto al porcentaje de la actividad de la suspensión de CLEAs luego de la experiencia de inactivación térmica en medio acuoso, el análisis de ANOVA (Anexo 10) arrojó que la variable que más influye en dicha respuesta es G, lo que tiene mucho sentido respecto a que es el agente de entrecruzamiento el que promueve la unión entre agregados enzimáticos. De la misma forma, la interacción de variables muestra ser más significativa es la relación entre G y R, lo que es debido a que aún cuando se ofrezca un alto valor de G, sería inútil si no se ofrece la cantidad de albúmina necesaria para mejorar el entrecruzamiento.

5.4 Utilización de dextrano aldehído como agente de entrecruzamiento

Respecto de la Figura 4.7 se puede mencionar que a las concentraciones de dextrano aldehído seleccionadas (1,7; 2,2 y 2,7 g/L) se obtienen actividades de síntesis máximas, las cuales son similares a las obtenidas con el CLEA óptimo elaborado con glutaraldehído.

Como se puede observar en la Tabla 4.6, el mayor tamaño de partícula de los CLEA preparados con dextrano aldehído es mucho mayor al obtenido con glutaraldehído a cualquier valor de pH. Esto concuerda con los resultados anteriores que muestran un aumento del tamaño de partícula al aumentar el pH del glutaraldehído (aumento de tamaño del agente de entrecruzamiento). Respecto al tamaño de partícula se puede observar en la Tabla 4.6 que al aumentar el tamaño de partícula hasta un valor de $65,9\mu\text{m}$, la actividad de hidrólisis también lo hace hasta un valor de $80\text{U}_\text{h}/\text{g}_{\text{CLEA}}$, luego de lo cual la relación entre tamaño de partícula y actividad de hidrólisis se hace inversamente proporcional, lo que indica el efecto de restricciones difusionales internas. Sin embargo, al comparar las tablas 4.2 y 4.6 se puede apreciar que a pesar de que los CLEA formados con dextrano aldehído son mucho más grandes (entre 50 y $120\mu\text{m}$ aproximadamente), las actividades específicas de hidrólisis son mayores (entre 55 y $80\text{U}_\text{h}/\text{g}_{\text{CLEA}}$) en comparación a las obtenidas con CLEAs entrecruzados con glutaraldehído a pH 4,5 (Tabla 4.2), los que muestran tamaños cercanos a $25\mu\text{m}$ y una actividad de hidrólisis entre 20 y $45\text{U}_\text{h}/\text{g}_{\text{CLEA}}$. Estos resultados hacen suponer que la estructura de los CLEA entrecruzados con dextrano aldehído es menos compacta que la del CLEA entrecruzado con glutaraldehído a pH 4,5 (mayormente monómeros de glutaraldehído).

Por otra parte, si se analiza la Tabla 4.7 se puede entender que al usar dextrano aldehído se mantiene un alto porcentaje de la actividad de hidrólisis de la suspensión de CLEAs en la mayoría de los casos, sin embargo, de esta actividad, la que permanece retenida en el CLEA después de una experiencia de estabilidad térmica de 50h es bastante baja, mostrando un valor máximo de 47,4%, lo que en el caso de la utilización de glutaraldehído llega a valores de 70,2% (ver Tabla 4.3). Lo anterior deja en evidencia que el dextrano aldehído no es un buen agente de entrecruzamiento de lipasas, impidiendo que el CLEA resultante pueda ser reutilizado. Según estos resultados, se optó por continuar el estudio con el CLEA óptimo elaborado con glutaraldehído a pH 11,2.

5.5 Variables implicadas en la producción de biodiesel con CLEA óptimo

Para poder realizar las experiencias de transesterificación de aceite de raps canola, previamente se caracterizó el aceite en términos del perfil de ácidos grasos (Tabla 4.8) para la cuantificación del índice de yodo. Según lo anterior se concluyó que el aceite de raps canola posee un índice de yodo de 112, que es menor al máximo permitido por la norma EN14214, por lo que es perfectamente útil en la producción de biodiesel. Con este parámetro se puede tener una idea de la calidad del producto final (biodiesel), ya que al poseer una alta cantidad de ácidos grasos monoinsaturados, el producto final posee una estabilidad oxidativa mayor a un aceite con presencia de ácidos grasos poliinsaturados como los aceites de pescado y microalgas.

Respecto al diseño del medio de reacción, se optó por considerar los factores más relevantes reportados por Antczak y colaboradores (2009), dentro de los cuales se encuentran los siguientes: tipo de alcohol usado como sustrato, el refinamiento del aceite empleado, el uso de co-solventes en el medio de reacción y la adición de agua al medio. Comparando las reacciones que utilizan metanol como aceptor de acilo (Tabla 4.9 y la Figura 4.8), se puede apreciar que en los casos en los que se utiliza agua en el medio de reacción (5%p/p respecto a la masa de aceite), el rendimiento de conversión de biodiesel fue el menor ya que en estos casos se produce la hidrólisis del triglicérido generando una mayor cantidad de ácidos grasos libres, los que no son totalmente esterificados a sus respectivos alquil ésteres. En el caso específico del uso de un medio de reacción compuesto solamente de metanol y aceite refinado de raps canola, no se aprecia una alta producción de ácidos grasos libres, lo que es debido a la pérdida de actividad del CLEA al estar en contacto con metanol. Al observar la Tabla 4.9 se puede concluir que sin el uso de co-solventes y sin adición de agua al medio de reacción, se logra minimizar la producción de ácidos grasos libres respecto al contenido inicial, produciéndose la mayor conversión de alquil ésteres de ácidos grasos.

Al analizar la Tablas 4.9 en conjunto con la Figura 4.9, se puede observar la misma tendencia de las experiencias realizadas con metanol, excepto en el caso en el que el medio de reacción está compuesto por etanol, aceite de raps canola refinado y agua, donde se producen altos niveles de ácidos grasos libres y mayor rendimiento de conversión de alquil ésteres de ácidos grasos en comparación al mismo con el uso de metanol. Estos resultados

concuerdan con los estudios que muestran que el metanol produce un efecto negativo mayor que el etanol sobre el biocatalizador usado en la producción de biodiesel (Bajaj *et al.*, 2010; Costa *et al.*, 2008; Du *et al.*, 2004; Ranganathan *et al.*, 2008). Por otra parte, en otras investigaciones (Kaieda *et al.*, 2001) se muestra un efecto positivo de la adición de agua sobre la conversión de metil ésteres de ácidos grasos al usar una lipasa de *B. cepacia* en medio acuoso para la transesterificación de aceite de soya. Según la metodología mencionada en el artículo referenciado, se cuantificó la cantidad de acilglicéridos para la determinación de los metil ésteres de ácidos grasos al igual que en la metodología 3.2.6, con lo que se podría incurrir en el error de no considerar la producción de ácidos grasos libres, los que podrían estar considerándose como parte de los metil ésteres, llegando a la conclusión errada de que la presencia de agua favorece el rendimiento de conversión de biodiesel. De este modo, en el presente trabajo se realiza la cuantificación de los ácidos grasos libres producidos debido a que el contenido de agua en el medio de reacción favorece la reacción de hidrólisis. Sin embargo, en el mejor de los casos (uso de etanol y aceite de raps canola refinado como medio de reacción) el porcentaje de ácidos grasos al cabo de 3 h de reacción fue de 2,4%, de los cuales el aceite de raps refinado posee 0,89%, el resto de los ácidos grasos libres podría producirse debido a la presencia de un 6,8% de humedad en el CLEA de lipasa PS, obteniéndose finalmente un máximo rendimiento de conversión de 70,5%p/p. Como se puede observar en la cinética de reacción de la Figura 4.9, en el caso de utilizar solamente etanol y aceite de raps canola refinado como medio de reacción, se podrían obtener rendimientos de conversión mayores a mayores tiempos de reacción, por lo que se han realizado experiencias a dichas condiciones a 20h de reacción, con lo que se obtienen rendimientos de reacción de aproximadamente 71,6%p/p (considerando la misma cantidad de ácidos grasos libres que a las 3h de reacción), con lo que se demuestra que la reacción se detiene a partir de las 3h de reacción.

En relación a las condiciones operacionales como la temperatura y carga de biocatalizador, se puede mencionar que según la Figura 4.10 la mejor opción es llevar a cabo la reacción de transesterificación a una temperatura de 40°C, que es la temperatura que generalmente se muestra como óptima para la transesterificación catalizada con lipasas (Dizge y Keskinler, 2008; Bajaj *et al.*, 2010). En cuanto a la razón E/S en el medio de reacción, se puede mencionar que según la Figura 4.11 las conversiones convergen a valores cercanos a 70%p/p luego de 20h de reacción. Sin embargo, con un E/S de 0,1, se obtiene una conversión aproximada de 73% a partir de tiempos cercanos a 3h, en cambio, con razones

E/S de 0,05 y 0,075 se logran rendimientos de 60%p/p y 63%p/p respectivamente. Si bien se podrían utilizar razones E/S menores a 0,1 basado en la disminución de los costos por concepto de biocatalizador, se ha optado por trabajar a una razón E/S de 0,1, para mediante el uso de estrategias, poder lograr obtener altas conversiones a un tiempo menor o igual a 20h.

Para resumir, las reacciones de transesterificación se llevaron a cabo en un medio que contiene solamente aceite de de raps canola refinado y etanol a una temperatura de 40°C, con una razón E/S de 0,1 y con una razón molar alcohol:aceite de 4:1. La Figura 4.12 se analizará de acuerdo a dichas condiciones y basado en la reacción secuencial de transesterificación de acilglicéridos mostrada en la Figura 2.1 a. Los perfiles de estas cinéticas muestran ser similares a las obtenidas mediante catálisis química (Knothe *et al.*, 2005). Analizando las cinéticas se puede mencionar que al inicio de la reacción se produce un rápido consumo de los triglicéridos debido a que la totalidad del sustrato se encuentra presente en esta forma. Por otra parte, cada cadena de ácidos grasos del triglicérido posee un espacio dentro del bolsillo hidrofóbico del sitio activo de la lipasa (Lang *et al.*, 1998), por lo que la lipasa podría presentar mayor afinidad por un triglicérido que por un monoglicérido o diglicérido. Sin embargo, la mayoría de los trabajos que han investigado el mecanismo de reacción de lipasas en la producción de alquil ésteres de ácidos, han supuesto que la constante de afinidad para cada acilglicérido es igual (Al-Zuhair, 2005; Al-Zuhair *et al.*, 2007), lo que se ha investigado y corroborado, logrando obtener un modelo que se ajusta a los datos experimentales en el cual las constantes de afinidad de la enzima con cada acilglicérido (mono, di y triglicéridos) son muy similares (Cheirsilp *et al.*, 2008).

Al analizar los diglicéridos se debe hacer hincapié en que existe un equilibrio entre la producción de diglicéridos producto de la transesterificación de los triglicéridos y la transesterificación de los diglicéridos para la producción de monoglicéridos, de este equilibrio se obtiene una curva con un máximo cercano a 33%p/p a los 45min de reacción, tiempo en el cual la transesterificación de diglicéridos pasa a ser mayor que la producción de éstos diglicéridos a partir de triglicéridos, luego de lo cual se puede observar la disminución de los diglicéridos en forma significativa hasta las 3h de reacción, quedando sin transesterificar un 11,1%p/p de los diglicéridos. Por otra parte, se muestra un aumento de los monoglicéridos sólo hasta 1,5h de reacción, pero en este caso también existe un equilibrio entre la

transesterificación de los monoglicéridos y la producción de éstos a partir de la transesterificación de diglicéridos. Entre los 45min y 3h de reacción se privilegia la transesterificación de diglicéridos, por lo que se deberían estar produciendo monoglicéridos durante este tiempo, lo que sólo se observa entre el inicio de la reacción y 1,5h de reacción, por lo que se puede concluir que entre 1,5h y 3h se están produciendo y transesterificando los monoglicéridos a la misma velocidad, razón por la cual la curva se ve aplanada en dicho rango de tiempo. Luego de las 3h la reacción se detiene casi por completo, lo que se puede apreciar debido a que ninguno de los intermediarios cambia su composición, quedando un 17,8%p/p de monoglicéridos en la mezcla de reacción. Además, el contenido de triglicéridos que permanece en la mezcla a las 3h de reacción es de 1,5%p/p. Realizando la suma de los 1,5% de triglicéridos que podrían convertirse en diglicéridos, se podría obtener un máximo de 12,6%p/p de éstos últimos (11,1%+1,5%), los que podrían convertirse finalmente en 12,6%p/p de monoglicéridos. Al sumar este 12,6% con el 17,8% de monoglicéridos remanentes en la mezcla de reacción, da una cantidad de 30,4%. Teniendo en cuenta que el máximo porcentaje de monoglicéridos que podría estar presente en la mezcla es de 33%, eso permite concluir que solamente un 2,6% de los monoglicéridos fue transesterificado a etil ésteres de ácidos grasos y glicerol. De esta forma, la cantidad de glicerol producido podría estar adsorbiéndose en la superficie del CLEA generando restricciones difusionales externas entre los intermediarios de la mezcla de reacción y el sitio activo de las lipasas presentes en el CLEA de lipasa PS, deteniendo la reacción a partir de las 3h. Este efecto negativo del glicerol sobre el rendimiento de conversión se ha reportado en algunos trabajos (Bako *et al.*, 2002; Tan *et al.*, 2010).

5.6 Estrategias de aumento de la conversión de alquil ésteres de ácidos grasos de aceite de raps/canola

Una de las estrategias que se ha abordado es la adición de etanol en pasos sucesivos. Con esto se ha pretendido determinar si el etanol está afectando negativamente el rendimiento de conversión de la reacción. Si este no es el caso, se podría atribuir el efecto negativo al glicerol, enfocando las siguientes estrategias a solucionar dicha situación. El etanol es soluble en el aceite a niveles de 2 equivalentes molares respecto a los triglicéridos (Shimada *et al.*, 2002). Sin embargo, para evitar el contacto directo del CLEA de lipasa PS con el

etanol, se realizó una reacción de transesterificación de aceite de raps canola con adición de etanol en 3 pasos sucesivos como se indica en el punto 4.6.1 y se ilustra en la Figura 4.13. Al adicionar el tercer equivalente molar, no se alcanza el 100% de rendimiento de conversión teórico, llegando sólo al 74%, lo que se debería a las restricciones difusionales externas provocadas por la acumulación de glicerol en las cercanías de la superficie del catalizador). Para asegurarse del rendimiento de conversión se realizó una medición a las 20h de reacción y se determinó que la conversión permanece aproximadamente en 74%p/p. Estos resultados indican que el etanol no sería el causante de la detención de la reacción, ya que de haber sido así, el efecto negativo sobre la conversión se hubiese observado desde el inicio de la reacción.

Por otra parte, se sabe que una reacción enzimática heterogénea se encuentra limitada por restricciones difusionales externas (RDE) cuando la velocidad de transporte del sustrato hacia el biocatalizador es lenta en relación al potencial catalítico de la enzima. Este tipo de restricciones es la que se daría en el caso de la adsorción de glicerol en las cercanías de la superficie del biocatalizador, provocando que se genere la detención de la reacción o que ésta avance a una baja velocidad (dada por la pendiente de la recta que se observa en las figuras 4.13, 4.14 y 4.17 a partir de las 2,5h, 3h y 5h respectivamente). Mientras menor sea la pendiente de dicha recta mayor sería la incidencia de RDE. En estricto rigor, para establecer si existen RDE se debería calcular el número de Damkoehler (α), el que está en función de parámetros cinéticos inherentes de la enzima inmovilizada (Illanes, 2002). Debido a que no se tienen estos valores, se optó por realizar la comparación entre las pendientes de las rectas que se generan en el transcurso de la reacción. En el caso de la Figura 4.13 la recta se forma entre los 150 y 240 minutos de reacción y posee una pendiente de 0,094 (%/min).

Para abordar el problema de la adsorción de glicerol en el biocatalizador se llevó a cabo el lavado de éste con un solvente orgánico como el *tert*-butanol. Según la Figura 4.15 se puede observar que al utilizar CLEA de lipasa PS se obtiene un margen de recuperación del rendimiento de conversión entre 18 y 22%p/p al lavar con *tert*-butanol y que al utilizar una razón E/S de 0,1 se obtiene un 69%p/p de conversión, recuperando gran parte del potencial catalítico en comparación con el rendimiento de conversión obtenido en la primera reacción (74%p/p).

Como se ha visto, al utilizar sílica gel en adición al biocatalizador en el medio de reacción, se logran rendimientos de conversión mayores a los obtenidos con CLEA de lipasa PS. En la Tabla 4.10 se puede ver el efecto de la cantidad de sílica gel en función de la conversión de biodiesel, donde se ve un incremento hasta un valor cercano a 90%p/p con un 20%p/p de sílica gel y una razón E/S de 0,1. De acuerdo a estos resultados se puede mencionar que la sílica gel estaría actuando como un aceptor de glicerol, removiéndolo de la mezcla de reacción, evitando su contacto con el CLEA para poder continuar de este modo la catálisis de la reacción. El hecho de que no se pueda llegar a rendimientos cercanos al 100% al adicionar más sílica gel puede deberse a que la sílica también podría estar adsorbiendo parte del etanol presente en el medio de reacción o a que la presencia de sílica gel podría estar rompiendo físicamente la estructura del CLEA, lo que provocaría finalmente su inactivación, lo que se puede observar en las experiencias de lavado y reutilización del CLEA usando sílica gel (Figura 4.15).

Según los resultados discutidos, se seleccionó un 20% de sílica gel para poder evaluar nuevamente la razón E/S en la reacción de transesterificación de aceite de raps canola, lo que se puede observar en la Figura 4.14. Al comparar las figuras 4.11 y 4.14 se puede observar que no existe diferencia en las cinéticas hasta un tiempo de reacción de 3h, luego de los cual en la Figura 4.14 la cinética se rige por una recta de pendiente 0,018; 0,018 y 0,016(%/min) para las reacciones con razones E/S de 0,05, 0,075 y 0,1 respectivamente, lo que se contrapone con las pendientes de la Figura 4.11 para el mismo rango de tiempo de 0,009; 0,008 y 0,001(%/min), lo que permite señalar que el uso de sílica gel en el medio de reacción disminuye las RDE. Por otra parte, el medio de reacción contiene un 30% de sólidos considerando un 20% de sílica gel y 10% de CLEA (E/S=0,1), lo que representa un dificultad operacional desde el punto de vista de la agitación y homogenización de la mezcla de reacción.

La última estrategia propuesta se encuentra relacionada con la generación de un CLEA de lipasa PS con superficie hidrofóbica. Para la elaboración de estos CLEA se planteó la oxidación de la lipasa para poder generar grupos aldehído en su superficie capaces de ser entrecruzados con los grupos amino aportados por los agentes de entrecruzamiento investigados (diaminas). De acuerdo a la oxidación se podrían generar un máximo de 70 grupos aldehído en la superficie de la lipasa PS, la mayoría de los cuales se muestra en la

Figura 4.16. Esto podría mejorar el entrecruzamiento, no siendo necesario el uso de albúmina; sin embargo, algunos de los grupos hidroxilo presentes en los residuos aminoacídicos oxidados, se encuentran formando parte del sitio activo (Serina 87) o en las cercanías de éste, lo que podría influir en la actividad del CLEA resultante. Como se puede observar en la Tabla 4.11, la proteína presente en el CLEA es entre 3 y 7 veces mayor a la cantidad determinada en los CLEA preparados con glutaraldehído o dextrano aldehído, no obstante, la mayoría de las actividades específicas de síntesis se encuentran en el mismo rango de valores, entregando indicios de que no toda la proteína presente posee actividad catalítica o que no se producen hiperactivaciones como las presentadas en la Figura 4.4 (excepto en el caso de los CLEA TMMS HMDA y CLEA TES DAHP).

Por otra parte, en la Tabla 4.12 se muestran los valores de los rendimientos de conversión obtenidos al utilizar 3 diferentes agentes de entrecruzamiento y 4 diferentes alcoxisilanos, los cuales se han usado en otro tipo de estudios para la hidrofobización de superficies (Panov y Terziev, 2009; Jesionowski *et al.*, 2010). Al analizar la Tabla 4.12 se puede observar que los mejores resultados en términos de rendimiento de conversión son los obtenidos utilizando PTES como alcoxisilano y luego los obtenidos con TMPS, lo que concuerda con lo mostrado en otros estudios que indican que estos alcoxisilanos presentan mayor hidrofobicidad (Panov y Terziev, 2009). Dentro de los resultados con PTES, los obtenidos entrecruzando con DAHP y HMDA son los mejores, no mostrando diferencias significativas considerando la desviación estándar de los datos, llegando a rendimientos cercanos a 97%p/p. Para poder seleccionar el CLEA que se utilizó en la elaboración de la cinética de reacción para la producción de biodiesel, se tomaron en cuenta los datos aportados por la Tabla 4.12, donde se puede ver que entre los dos CLEA mencionados anteriormente, el CLEA PTES DAHP muestra un bajo rendimiento de inmovilización, tanto en masa como en actividad, por lo que se ha optado por seleccionar el CLEA PTES HMDA. Por otra parte, se puede hacer notar que a pesar de que el CLEA PTES HMDA produce una conversión cercana a 97%p/p, su actividad de transesterificación es menor a la obtenida con el CLEA óptimo elaborado con glutaraldehído a pH 11,2. Esto puede tener relación con el hecho de que el rendimiento máximo de la reacción se ve limitado por la capacidad del sistema de evitar el contacto con glicerol, lo que produce limitaciones de transferencia de masa entre el sustrato y el catalizador y no se relaciona con el máximo potencial catalítico del biocatalizador a tiempos cortos de reacción. En la Tabla 4.12 se muestra que al obtener rendimientos de inmovilización cercanos al 50% considerando la masa, se obtiene un CLEA con un mayor contenido de proteína, lo que se

traduce en que gran parte de la masa que no se está inmovilizando no es masa de lipasa, lo que produce que ésta se concentre en el CLEA, lo que no necesariamente se refleja en una alta actividad específica de transesterificación, pero si en un mayor rendimiento de conversión si se coteja con la Tabla 4.11. No obstante, no es suficiente un alto contenido de proteína para obtener un alto rendimiento de conversión, ya que en el caso de los CLEA PTES MXDA y CLEA TMPS MXDA se logran conversiones de 83,1%p/p y 82%p/p respectivamente, lo que puede deberse principalmente al efecto del agente de entrecruzamiento, ya que como se muestra en la tabla anteriormente mencionada, los menores valores de conversión son los obtenidos usando MXDA como agente de entrecruzamiento. Por el contrario, el uso de DAHP produce los CLEA con mayor rendimiento de conversión, obteniéndose valores cercanos a 90%p/p incluso con un bajo contenido de proteína en el CLEA.

Por otra parte, no se observa un marcado efecto de las condiciones de elaboración del CLEA hidrofóbico (distintos agentes de entrecruzamiento y alcoxisilanos) sobre el tamaño de partícula, lo que se debe muy probablemente a que se están usando las mismas concentraciones de cada agente de entrecruzamiento y alcoxisilano.

Basándose en las reacciones secuenciales de transesterificación de acilglicéridos mostrada en la Figura 2.1 a, se puede observar que en la Figura 4.17 se produce un rápido consumo de los triglicéridos al igual que en el caso de la Figura 4.12. Al analizar los diglicéridos se debe hacer hincapié en que existe un equilibrio entre la producción de diglicéridos producto de la transesterificación de los triglicéridos y la transesterificación de los diglicéridos para la producción de monoglicéridos, de este equilibrio se obtiene una curva con un máximo cercano a 25%p/p a las 1,5h de reacción, tiempo en el cual la transesterificación de diglicéridos pasa a ser mayor que la producción de éstos diglicéridos a partir de triglicéridos, luego de lo cual se puede observar la disminución de los diglicéridos en forma significativa hasta las 5h de reacción, continuando con un consumo más lento entre las 5 y las 20h de reacción, quedando sin transesterificar un 1,8%p/p de los diglicéridos. Por otra parte, se muestra un aumento de los monoglicéridos sólo hasta 1,5h de reacción, pero en este caso también existe un equilibrio entre la transesterificación de los monoglicéridos y la producción de éstos a partir de la transesterificación de diglicéridos. Entre las 1,5 y las 20h de reacción se privilegia la transesterificación de diglicéridos, por lo que se deberían estar produciendo

monoglicéridos durante este tiempo, lo que sólo se observa entre el inicio de la reacción y 1,5h de reacción, por lo que se puede concluir que entre 1,5h y 20h se están privilegiando la lenta transesterificación de los monoglicéridos, con lo que se comenzaría a producir glicerol, observándose el decaimiento de la pendiente en la Figura 4.17. Por otra parte, se puede apreciar que a partir de las 5h de reacción el aumento del rendimiento de conversión se ve regido por una recta, la que posee una pendiente de 0,02(%/min), que es un poco mayor a la obtenida con el uso de sílica gel en el medio de reacción. Sin embargo, en el uso de CLEA PTES HMDA la recta comienza a las 5h de reacción con un rendimiento de 79%p/p, por lo que se consigue una conversión mayor luego de 20h. Además, en este caso se usa un 10%p/p de sólidos en el medio de reacción, en cambio al usar sílica gel, se debe trabajar con un 30% de sólidos en el medio de reacción.

Estos avances respecto a lograr altos rendimientos de conversión de biodiesel son de gran importancia a nivel de investigación, ya que hasta la fecha sólo se han logrado obtener rendimientos de conversión similares a los mencionados en el presente trabajo mediante las siguientes estrategias:

- Uso de co-solventes en el medio de reacción (Royon *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2006), aumentando el volumen de reacción y por lo tanto el volumen del reactor, incurriendo además en un mayor gasto energético y económico debido a la necesidad de evaporar el co-solvente para poder separarlo del producto final.
- La adición del alcohol en pasos sucesivos en conjunto con la remoción de glicerol mediante diálisis o lavado con solventes (Bako *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2004).
- La adición del alcohol en pasos sucesivos y la preincubación del biocatalizador en metil oleato y aceite de soya (Samukawa *et al.*, 2000).

Todas estas estrategias implican un alto costo y una complicación operacional. La alternativa que se presenta en este estudio es el uso directo del biocatalizador en un medio de reacción que sólo considera el aceite y el alcohol (razón alcohol aceite es alta, eso tiene sentido?), por lo que representa una opción fácil de implementar y de bajo costo.

Se ha determinado el porcentaje de actividad residual de la suspensión de CLEA PTES HMDA y el porcentaje de actividad residual en el CLEA luego de una experiencia de

inactivación térmica de 50h en medio acuoso para tener una idea de la intensidad de unión (entrecruzamiento) de la lipasa con su agente de entrecruzamiento y poder comparar estos datos respecto a los obtenidos con los CLEA no hidrofóbicos. Al respecto, se ha determinado que el porcentaje de actividad de la suspensión es de un 66,7% con un valor de actividad de hidrólisis inicial muy bajo ($18U_h/g_{CLEA}$) en comparación con las actividades de los CLEA elaborados con glutaraldehído, lo que tiene sentido debido a que los CLEA PTES HMDA son hidrofóbicos y por lo tanto la reacción de hidrólisis se ve desfavorecida. Por otro lado, el porcentaje de actividad residual en el CLEA fue de 62,7%, lo que representa un alto porcentaje respecto a los mostrados con CLEAs de lipasa elaborados tanto con glutaraldehído como con dextrano aldehído, dando cuenta de un buen entrecruzamiento a pesar de no haber adicionado otra fuente de grupos aldehído para mejorar el entrecruzamiento con los grupos amino aportados por los agentes de entrecruzamiento usados.

6 Conclusión

- De las nueve lipasas solubles comerciales evaluadas, la que posee las mejores propiedades (actividad de síntesis y estabilidad en presencia de metanol) para su uso en la producción de biodiesel es la lipasa PS de *B. cepacia*, siendo seleccionada para la preparación de CLEAs.
- De acuerdo a los resultados obtenidos de la metodología de superficie de respuesta, la máxima actividad de síntesis de un CLEA de lipasa PS se obtiene al prepararlo con una solución de glutaraldehído a pH 11,2, una concentración de glutaraldehído de 36,8mM y una razón enzima/albúmina de 18,4mg/mg.
- La mejor condición para la producción de biodiesel usando CLEA de lipasa PS óptimo, es usando etanol (razón molar 4:1 alcohol:aceite), aceite de raps canola refinado, sin uso de co-solventes y sin adición de agua al medio de reacción.
- La adición de de una superficie hidrofílica no catalítica (sílica gel) al inicio de la reacción de transesterificación de aceite de raps logró aumentar el rendimiento de conversión de etil ésteres de ácidos grasos. La superficie hidrofílica sería capaz de adsorber glicerol, retardando el contacto de éste subproducto de la transesterificación con el biocatalizador.
- El uso de CLEAs con superficie hidrofóbica en la reacción de transesterificación de aceite de raps con etanol permitió obtener rendimientos de conversión de 97%p/p, lo que representa uno de los mayores rendimiento de conversión reportados actualmente mediante el uso de un biocatalizador. De esta forma, se evitó el contacto del glicerol con el biocatalizador, logrando la producción de biodiesel sin tener que adicionar una alta masa de sólidos como en el caso de la sílica gel.

- Para terminar, se debe mencionar que se ha contrastado empíricamente la hipótesis, obteniendo como resultado su comprobación y verificación.

7 Recomendaciones

- Se recomienda realizar un análisis de los biocatalizadores para determinar su área superficial específica y porosidad mediante el método BET y BJH respectivamente, los que se basan en isothermas de adsorción y desorción de nitrógeno. Con dichos datos se podría proponer un modelo estructural de los CLEA formados dependiendo del agente de entrecruzamiento y algunas variables de interés y significancia como la concentración del agente de entrecruzamiento y la razón enzima/albúmina. Además se podrían analizar también los CLEA con superficie hidrofóbica, pudiendo observar el efecto de los distintos alcoxisilanos y/o agentes de entrecruzamiento en el área superficial específica.
- Debido a la diferencia de velocidades a las cuales se transesterifican los intermediarios, sería conveniente realizar la transesterificación de monoglicéridos y diglicéridos para determinar las constantes de afinidad de la lipasa PS con dichos sustratos. Además, se recomienda proponer un mecanismo de reacción considerando las distintas afinidades de la enzima dependiendo del sustrato para modelar la reacción de transesterificación de aceite de raps canola catalizada por el CLEA de lipasa PS. Esto representaría un gran avance debido a que a partir del mecanismo propuesto se podría obtener tanto la expresión para la velocidad de reacción como los parámetros cinéticos de la reacción con el CLEA de lipasa, permitiendo el desarrollo y diseño de reactores enzimáticos que puedan maximizar el rendimiento de conversión de biodiesel.
- Debido a que la sílica gel puede adsorber el glicerol generado como subproducto de la reacción de transesterificación, se recomienda el uso de reactores de lecho empacado en serie, donde el primer reactor podría contener solamente CLEA de lipasa PS, para luego pasar a un reactor con una mezcla de CLEA y sílica gel, con lo que se podría llegar a rendimientos de conversión mayores a 90%. Esto tendría como ventaja una fácil operación del sistema, la posibilidad de disminuir los tiempos de reacción y la facilidad de lavar los reactores mediante el paso de *tert*-butanol para la remoción de glicerol y posterior reutilización del sistema.

- Para intentar mejorar la productividad del proceso, se recomienda realizar la búsqueda de otros alcoxisilanos que puedan entregar un alto rendimiento de conversión en el menor tiempo posible.
- Se propone además, realizar un estudio de los parámetros cinéticos usando un CLEA hidrofóbico y otro sin hidrofobizar, lo que podría entregar información acerca del cambio de afinidad hacia los distintos intermediarios de la reacción.
- Con el fin de poder comparar la calidad del producto final (biodiesel) del proceso que utiliza un catalizador químico y del proceso que utiliza biocatalizadores (en este caso CLEA de lipasa PS hidrofóbico), se propone la caracterización del biodiesel, lo que permitirá distinguir si existe alguna otra ventaja o desventaja del proceso enzimático por sobre el químico.

Referencias

- Abigor, R., P. Uadia, T. Foglia, M. Haas, K. Jones, E. Okpefa, J. Obibuzor and M. Bafor. 2000. Lipase-catalyzed production of biodiesel fuel from some Nigerian lauric oils. *Biochem. Soc. Trans.* 28: 979-981.
- Al-Zuhair S. 2005. Production of biodiesel by lipase-catalyzed transesterification of vegetable oils: a kinetic study. *Biotechnol. Prog.* 21 (5): 1442–1448.
- Al-Zuhair S., F.W. Ling and L.S. Jun. 2007. Proposed kinetic mechanism of the production of biodiesel from palm oil using lipase. *Process Biochem.* 42: 951–960.
- Amin, S. 2009. Review on biofuel oil and gas production processes from microalgae. *Energy Convers. Manage.* 50: 1834–1840
- Antczak, M.S., A. Kubiak, T. Antczak and S. Bielecki. 2009. Review: Enzymatic biodiesel synthesis – Key factors affecting efficiency of the process. *Renew. Energ.* 34: 1185-1194.
- Aytar, B.S. and U. Bakir. 2008. Preparation of cross-linked tyrosinase aggregates. *Process Biochem.* 43: 125–131.
- Azócar, L., G. Ciudad, H.J. Heipieper, R. Muñoz, R. Navia. 2010. Improving fatty acid methyl ester production yield in a lipase-catalyzed process using waste frying oils as feedstock. *Journal Biosci. Bioeng.* 109(6): 609-614.
- Bajaj, A., P. Lohan, P.N. Jha and R. Mehrotra. 2010. Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: An overview. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 62: 9-14.
- Bako, K.B., F.C.S. Kova, L. Gubicza and J.K. Hansco. 2002. Enzymatic biodiesel production from sunflower oil by *Candida antarctica* lipase in a solvent free system. *Biocatal. Biotransform.* 20: 437-439.
- Bala, B.K. 2005. Studies on biodiesels from transformation of vegetable oils for diesel engines. *Energy Edu. Sci. Technol.* 2005; 15: 1–43.
- Ban K., M. Kaieda, T. Matsumoto, A. Kondo and H. Fukuda. 2001. Whole cell biocatalyst for biodiesel fuel production utilizing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles. *Biochem. Eng. J.* 8: 39-43.

Bastida, A. P., P. Sabuquillo, R. Armisen, J. Fernandez-Lafuente, J. Hugué and J.M. Guisán. 1998. A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. *Biotechnol. Bioeng.* 58(5): 486–493.

Belafibako, K., F. Kovács, L. Gubicza and J. Hancsók. 2002. Enzymatic biodiesel production from sunflower oil by *Candida antarctica* lipase in a solvent-free system. *Biocatal. Biotransform.* 20(6): 437–439

Blanco, R.M., P. Terreros, N. Muñoz and E. Serra. 2007. Ethanol improves lipase immobilization on a hydrophobic support. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 47: 13-20.

Brady, C., A. M. Brzozowski, Z. S. Derewenda, E. Dodson, G. Dodson, S. Tolley, J. P. Turkenburg, L. Christiansen, B. Høge-Jensen, L. Norskov, L. Thim and U. Menge. 1990. A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. *Nature* 343: 767-770

Bryjak, J. and B. N. Kolarz. 1998. Immobilisation of trypsin on acrylic copolymers process. *Biochemistry* 33:409-417.

Cabana, H., J. P. Jones and S. N. Agathos. 2007. Preparation and characterization of cross-linked laccase aggregates and their application to the elimination of endocrine disrupting chemicals. *J. Biotechnol.* 132: 23–31.

Cabral, J. M. S. and J. F. Kennedy. 1993. Immobilisation techniques for altering thermal stability of enzymes. In: Gupta M. N. (Eds.), *Thermostability of Enzymes*, pp 163-179. Berlin Springer Verlag.

Cabrera Z., G. Fernandez-Lorente, R. Fernandez-Lafuente, J. M. Palomo and J. M. Guisán. 2009. Novozym 435 displays very different selectivity compared to lipase from *Candida antarctica* B adsorbed on other hydrophobic supports. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 57: 171-176.

Canakci, M. and J. van Gerpen. 2001. Biodiesel production from oils and fats with high free fatty acids. *Trans ASAE.* 44: 1429–1436.

Cao, L., L. M. van Langen, F. van Rantwijk and R. A. Sheldon. 2000. Cross-linked Enzymes Aggregates: A Simple and Effective Method for the Immobilization of Penicillin Acylase. *Org. Lett.* 2: 1361-1364.

Cao, L., L. M. van Langen, F. van Rantwijk and R. A. Sheldon. 2001. Cross-linked aggregates of penicillin acylase: robust catalysts for the synthesis of β -lactam antibiotics. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 1: 665-670.

- Cao, L., L. van Langen and R. A. Sheldon. 2003. Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier-free? *Curr. Opin. Biotechnol.* 14:387–394
- Chang, H., H. Liao, C. Lee, and C. Shieh. 2005. Optimized synthesis of lipase-catalyzed biodiesel by Novozym 435. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 80: 307-312.
- Cheirsilp, B., W. Kaewthong and A. H-Kittikun. 2007. Kinetic study of glycerolysis of palm olein for monoacylglycerol production by immobilized lipase. *Biochem. Eng. J.* 35(1): 71–80
- Chen, J. W. and W. T. Wu. 2003. Regeneration of immobilized *Candida antarctica* lipase for transesterification. *J. Biosci. Bioeng.* 95 (5): 466–469
- Chen, X., W. Du and D. Liu. 2008. Effect of several factors on soluble lipase-mediated biodiesel preparation in the biphasic aqueous-oil systems. *World J. Microbiol. Biotechnol.* doi: 10.1007/s11274-008-9714-6.
- Cheng, L. H., S. Y. Yen, L. S. Su and J. Chen. 2010. Study on membrane reactors for biodiesel production by phase behaviors of canola oil methanolysis in batch reactors. *Bioresour Technol.* 101(17): 6663-6668.
- Cheung, D. T. and M. E. Nimni. 1982. Mechanism of crosslinking of proteins by glutaraldehyde II. Reaction with monomeric and polymeric collagen. *Connect. Tissue Res.* 10(2): 201-216.
- Clark, D.S. 1994. Can immobilisation be exploited to modify enzyme activity? *Trends Biotechnol.* 2:439-443.
- Costa, R., G. Volpato, K. Wada and M. A. Zachia. 2008. Enzymatic Synthesis of Biodiesel from Transesterification Reactions of Vegetable Oils and Short Chain Alcohols. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 85: 925-930.
- Dalal, S., M. Kapoor and M. N. Gupta. 2007. Preparation and characterization of combi-CLEAs catalyzing multiple non-cascade reactions. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 44: 128–132.
- De, B. K., D. K. Bhattacharya and C. Bandhu. 1999. Enzymatic synthesis of fatty alcohol esters by alcoholysis. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 76: 451-453.
- Demirbas, A. 2008. Biodiesel: A Realistic Fuel Alternative for Diesel Engines pp. 39-40. London Springer-Verlag.
- Demirbas, A. 2005. Biodiesel production from vegetable oils via catalytic and non-catalytic supercritical methanol transesterification methods. *Prog. Energy Combust. Sci.* 31: 466–487.

Dizge, N. and B. Keskinler. 2008. Enzymatic production of biodiesel from canola oil using immobilized lipase. *Biomass and Bioenergy* 32(12): 1274-1278.

Dizge, N., B. Keskinler and A. Tanriseven. 2009. Biodiesel production from canola oil by using lipase immobilized onto hydrophobic microporous styrene-divinylbenzene copolymer. *Biochem. Eng. J.* 44: 220-225.

Dossat, V., D. Combes and A. Marty. 1999. Continuous enzymatic transesterification of high oleic sunflower oil in a packed bed reactor: Influence of the glycerol production. *Enzyme Microb. Technol.* 25(3-5):194-200

Dorado, M. P., E. Ballesteros, F. J. López and M. Mittelbach. 2004. Optimization of Alkali-Catalyzed Transesterification of *Brassica Carinata* Oil for Biodiesel Production. *Energ. Fuel.* 18: 77-83

Drapcho, C. M., N. P. Nhuan and T. H. Walker. 2008. *Biofuels Engineering Process Technology* pp. 199-204. McGraw-Hill.

Du, W., Y. Xu, D. Liu and J. Zeng. 2004. Comparative study on lipase-catalyzed of soyabean oil for biodiesel production with acyl acceptors. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 30: 125-129.

Fjerbaek, L., K. V. Christensen and B. Norddahl. 2009. Review of the current state of biodiesel production using enzymatic transesterification. *Biotechnol. Bioeng.* doi 10.1002/bit.22256

Gerhartz, W. 1990. Immobilization. In: W. Gerhartz (Ed.), *Enzymes in Industry*, pp. 64-70. New York: VCH Publishers.

Ghadge, S. V. and H. Raheman. 2006. Process optimization for biodiesel production from mahua (*Madhuca indica*) oil using response surface methodology. *Bioresour Technol.* 97: 379-384.

Gogoi, S., S. Hazarika, P. G. Rao and N. N. Dutta. 2006. Esterification of lauric acid with lauryl alcohol using cross-linked enzyme crystals: Solvent effect and kinetic study. *Biocatal. Biotransfor.* 24(5): 343-351.

Guo, Z., S. Bai and Y. Sun. 2003. Preparation and characterization of immobilized lipase on magnetic hydrophobic microspheres. *Enzyme Microb. Technol.* 32: 776-782.

- Gupta, N., P. Rathi and R. Gupta. 2002. Simplified *para*-nitrophenyl palmitate assay for lipases and esterases. *Anal. Biochem.* 311: 98-99.
- Gutiérrez, H. and R. de la Vara. 2004. Análisis y diseño de experimentos pp. 470-520. México: McGraw-Hill Interamericana.
- Ha, S. H., M. N. Lanb, S. H. Lee, S. M. Hwang and Y. M. Koo. 2007. Lipase-catalyzed biodiesel production from soybean oil in ionic liquids. *Enzyme Microb. Technol.* 41:480-483.
- Haas, M. J., A. J. McAloon, W. C. Yee and T. A. Foglia. 2006. A process model to estimate biodiesel production costs. *Bioresour Technol.* 97: 671-678
- Habeeb, A.F.S.A. 1967. Preparation of enzymically active, waterinsoluble derivatives of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.* 119:264-268.
- Hajar, M., S. Shokrollahzadeh, F. Vahabzadeh and A. Monazzami. 2009. Solvent-free methanolysis of canola oil in a packed-bed reactor with use of Novozym 435 plus loofa. *Enzyme Microb. Tech.* 45(3): 188-194.
- Hama, S., H. Yamaji, T. Fukumizu, T. Numata, S. Tamalampudi, A. Kondo, H. Noda and H. Fukuda. 2007. Biodiesel-fuel production in a packed-bed reactor using lipase-producing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles. *Chem. Eng. J.* 34: 273-278
- Hara, P., U. Hanefeld and L.T. Kanerva. 2008. Sol-gels and cross-linked aggregates of lipase PS from *Burkholderia cepacia* and their application in dry organic solvents. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 50: 80-86
- Hermansyah, H., M. Kubo, N. Shibasaki-Kitakawa and T. Yonemoto. 2006. Mathematical model for stepwise hydrolysis of triolein using *Candida rugosa* lipase in biphasic oil-water system. *Biochem. Eng. J.* 31: 125-132
- Hirose, Y. 2002. Production and Isolation of enzymes. In: K. Drauz and H. Waldmann (Eds.), *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, pp. 62-63, Germany VCH Publishers
- Hofland, G.W., A. de Rijke, R. Thiering, L. A. M. van der Wielen and G. J. Witkamp. 2000. Isoelectric precipitation of soybean protein using carbon dioxide as a volatile acid. *J. Chromatogr. B.* 743: 357- 368

Hsu, A., K. C. Jones, T. A. Foglia, and W. N. Marmer. 2004. Transesterification activity of lipases immobilized in a phyllosilicate sol-gel matrix. *Biotechnol. Lett.* 26: 917–921

Huang, G., F. Chen, D. Wei, X. W. Zhang and G. Chen. 2010. Biodiesel production by microalgal biotechnology. *Appl. Energ.* 87: 38–46

Illanes, A., L. Wilson, C. Altamirano, Z. Cabrera, L. Alvarez and C. Aguirre. 2007. Production of cephalixin in organic medium at high substrate concentrations with CLEA of penicillin acylase and PGA-450. *Enzyme Microb. Tech.* 40: 195–203

Illanes, A. 2002. Cinética Enzimática en Fase Heterogénea. En: Acevedo, F., J. C. Gentina y A. Illanes (Eds.), pp. 72-78, Valparaíso, Ediciones Universitarias de Valparaíso de la Universidad Católica de Valparaíso

Illanes, A. 1994. Biotecnología de enzimas 252 pp. Valparaíso, Ediciones Universidad de Valparaíso de la Universidad Católica de Valparaíso

Iso, M., B. Chem, M. Eguchi, T. Kudo and S. Shrestha. 2001. Production of Biodiesel from triglycerides and ethanol using immobilized enzyme. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 16: 53-58

Issariyakul, T., M. G. Kulkarni, L. C Meher, A. K. Dalai and N. N. Bakhshi. 2008. Biodiesel production from mixtures of canola oil and used cooking oil. *Chem. Eng. J.* 140:77-85

Jaeger K. E. and T. Eggert. 2002. Lipases for Biotechnology. *Biotechnology* 13: 390-397

Jansen E. F. and A. C. Olson. 1969. Properties and enzymatic activities of papain insolubilized with glutaraldehyde. *Arch. Biochem. Biophys.* 129:221-228

Janssen, A.E.M., A. M. Vaidya, P. J. Halling. 1996. Substrate specificity and kinetics of *Candida rugosa* lipase in organic media. *Enzyme Microb. Technol.* 18: 340-346

Janssen, M. H. A., L. M. van Langen, S. R. M. Pereira, F. van Rantwijk and R. A. Sheldon. 2002. Evaluation of the performance of immobilized penicillin G acylase using active-site titration. *Biotechnol. Bioeng.* 78:425-432

Jeong, G. T., D. H. Park, C. H. Kang, W. T. Lee, C. S. Sunwoo, C. H. Yoon, B. C. Choi, H. S. Kim, S. W. Kim, and U. T. Lee. 2004. Production of Biodiesel Fuel by Transesterification of Rapeseed Oil. *Appl. Biochem. Biotech.* 113: 747-758

Jesionowski, T., F. Ciesielczyk and A. Krysztalkiewicz. 2010. Influence of selected alcoxysilanes on dispersive properties and surface chemistry of spherical silica precipitated in emulsion media. *Material Chem. Physic.* 119: 65-74

Kaieda, M., T. Samukawa, T. Matsumoto, K. Ban, A. Kondo, Y. Shimada, H. Noda, F. Nomoto, K. Ohtsuka, E. Izumoto and H. Fukuda. 1999. Biodiesel fuel production from plant oil catalyzed by *Rhizopus oryzae* lipase in a water-containing system without an organic solvent. *J. Biosci. Bioeng.* 88:627-631

Kaieda, M., T. Samukawa, A. Kondo and H. Fukuda. 2001. 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(1): 12-15

Knothe, G. 2006. Analyzing Biodiesel: Standards and Other Methods. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 83(10):823-833

Köse, Ö., M. Tüter and H. A. Aksoy. 2002. Immobilized *Candida antarctica* lipase-catalyzed alcoholysis of cotton seed oil in a solvent-free medium. *Bioresource Technol.* 83: 125–129

Kumari, V., S. Shah and M. N. Gupta. 2007. Preparation of Biodiesel by Lipase-Catalyzed Transesterification of High Free Acid Containing Oil from *Madhuca indica*. *Energ. Fuel.* 21: 368-372

Kusdiana, D. and S. Saka. 2001. Kinetics of transesterification in rapeseed oil to biodiesel fuel as treated in supercritical methanol. *Fuel* 80: 693-698

Lang, D. A., M. L. M. Mannesse, G. H. de Hass, H. M. Verheij and B. W. Dijkstra. 1998. Structural basis of the chiral selectivity of *Pseudomonas cepacia* lipase. *Eur. J. Biochem.* 254: 333-340

Laothanachareon T., V. Champreda, P. Sritongkham, M. Somasundrum and W. Surareungchai. 2008. Cross-linked enzyme crystals of organophosphate hydrolase for electrochemical detection of organophosphorus compounds. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24: 3049-3055.

Lee, K. M., M. Blaghen, J. P. Samama and J. F. Biellmann. 1986. Cross-linked crystalline horse liver alcohol dehydrogenase as a redox catalyst: activity and stability towards organic solvent. *Bioorg. Chem.* 14:202-210

Li, L., W. Du, D. Liu, L. Wang and Z. Li. 2006. Lipase-catalyzed transesterification of rapeseed oils for biodiesel production with a novel organic solvent as the reaction medium. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 43: 58-62

Li, W., W. Du and D. H. Liu. 2007a. *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

Li, W., W. Du and D. Liu. 2007b. Optimization of whole cell-catalyzed methanolysis of soybean oil for biodiesel production using response surface methodology. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 45: 122-127

Li, Y., Z. Zhao and F. Bai. 2007c. High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodosporidium toruloides* Y4 in fed-batch culture. *Enzyme Microb. Tech.* 41: 312-317

Li, Q., W. Du and D. Liu. 2008a. Perspectives of microbial oils for biodiesel production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80: 749-756

Li, W., W. Du, D. Liu and Y. Yao. 2008b. Study on factor influencing stability of whole cell during biodiesel production in solvent-free and tert-butanol system. *Biochem. Eng. J.* doi:10.1016/j.bej.2008.04.003

Li, E., Z. P. Xu and V. Rudolph. 2009. MgCoAl-LDH derived heterogeneous catalysts for the ethanol transesterification of canola oil to biodiesel. *Appl. Catal. B: Environ.* 88: 42-49

Linko, Y. Y., M. Lämsä, X. Wu, W. Uosukainen, J. Sappälä and P. Linko. 1998. Biodegradable products by lipase biocatalysis. *J. Biotechnol.* 66: 41-50

López-Serrano, P., L. Cao, F. van Rantwijk and R. A. Sheldon. 2002. Cross-linked enzyme aggregates with enhanced activity: Application to lipases. *Biotechnol. Lett.* 24: 1379-1383

Luo, Y., Y. Zheng, Z. Jiang, Y. Ma and D. Wei. 2006. A novel psychrophilic lipase from *Pseudomonas fluorescens* with unique property in chiral resolution and biodiesel production via transesterification. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73: 349-355

Ma, F. and M. A. Hanna. 1999. Biodiesel production: a review. *Bioresource Technol.* 70:1-15

Madras, G., C. Kolluru and R. Kumar. 2004. Synthesis of biodiesel in supercritical fluids. *Fuel* 83: 2029-2033

Margel, S. and A. Rembaum. 1980. Synthesis and characterization of poli(glutaraldehyde). A potential reagent for proteína immobilization and cell separation. *Macromolecules* 13: 19-24

Mateo, C., J. M. Palomo, L. M. van Langen, F. van Rantwijk and R. A. Sheldon. 2004. A new, mild cross-linking methodology to prepare cross-linked enzyme aggregates. *Biotechnol Bioeng.* 86: 273-276

Meher, L. C., D. V. Sagar and S. N. Naik. 2006. Technical aspects of biodiesel production by transesterification- a review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 10: 248-268

Miled, N., F. Beisson, J. de Caro, A. de Caro, V. Arondel and R. Verger. 2001. Interfacial catalysis by lipases. *J Mol Catal B: Enzym.* 11(4-6): 165-171

Mittelbach, M. 1990. Lipase catalyzed alcoholysis of sunflower oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 67(3): 168-170

Modi, M. K., J. R. C. Reddy, B. V. S. K. Rao and R. B. N. Prasad. 2006. Lipase mediated transformation of vegetable oils into biodiesel using propane-2-ol as acyl acceptor. *Biotechnol. Lett.* 28: 637-640

Modi, M. K., J. R. C. Reddy, B. V. S. K. Rao and R. B. N. Prasad. 2007. Lipase-mediated conversion of vegetable oils into biodiesel using ethyl acetate as acyl acceptor. *Bioresource Technol.* 98: 1260-1264

Nelson, L. A., T. A. Foglia and W. N. Marmer. 1996. Lipase-catalyzed production of biodiesel. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 73(8): 1191-1195

Noritomi H., A. Sasanuma, S. Kato and K. Nagahama. 2007. Catalytic properties of cross-linked enzyme crystals in organic media. *Biochem. Eng. J.* 33: 228-231.

Noureddini, H. and D. Zhu. 1997. Kinetics of Transesterification of soybean oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 74: 1457-1463

Noureddini, H., X. Gao and R. S. Phikana. 2005. Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from Soyabean oil. *Bioresource Technol.* 96: 767-777

Orcaire, O., P. Buisson and A. C. Pierre. 2006. Application of silica aerogel encapsulated lipases in the synthesis of biodiesel by transesterification reactions. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 42: 106-113

Palomo, J. M., G. Muñoz and G. Fernández-Lorente. 2002. Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl-Sepabeads): immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 19–20: 279–286

Panov, D. and N. Terziev. 2009. Study on some alkoxy silanes used for hydrophobation and protection of wood against decay. *International Biodeterioration & Biodegradation* 63(4): 456-461

Pedroche, J., M. Yust, C. Mateo, R. Fernández-Lafuente, J. Girón-Calle, M. Alaiz, J. Vioque, J. M. Guisán and F. Millán. 2007. Effect of the support and experimental conditions in the intensity of the multipoint covalent attachment of proteins on glyoxyl-agarose supports: Correlation between enzyme–support linkages and thermal stability. *Enzyme Microb. Tech.* 40: 1160–1166

Prento, P. 1995. Glutaraldehyde for electro microscopy: a practical investigation of commercial glutaraldehydes and glutaraldehyde-storage conditions. *Histochem. J.* 27: 906-913

Puppan, D. 2002. Environmental evaluation of biofuels. *Periodica Polytechnica Ser. Soc. Man. Sci.* 10: 95–116

Qin, H., X. Yan, T. Yun, W. Dong. 2008. Biodiesel Production Catalyzed by Whole-Cell Lipase from *Rhizopus chinensis*. *Chin. J. Catal.* 29(1): 41-46

Quioco, F. A. and F. M. Richards. 1964. Intermolecular cross-linking of a protein in the crystalline state: carboxypeptidase A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 52:833-839

Quioco, F. A. and F. M. Richards. 1966. The enzyme behaviors of carboxypeptidase-A in the solid state. *Biochemistry* 5:4062-4076

Ranganathan, S. V., S. L. Narasimhan and K. Muthukumar. 2008. An overview of enzymatic production of biodiesel. *Bioresource Technol.* 99: 3975-3081

Reyes, H. R. and C. G. Hill. 1994. Kinetic modeling of interesterification reactions catalyzed by immobilized lipase. *Biotechnol. Bioeng.* 43: 171–182

Rocchietti, S., A. S. V. Urrutia, M. Pregnolato, A. Tagliani, J. M. Guisán, R. Fernandez-Lafuente and M. Terreni. 2002. Influence of the enzyme derivative preparation and substrate structure on the enantioselectivity of penicillin G acylase. *Enzyme Microb. Technol.* 31:88-93

Rothstein, F. 1994. Differential precipitation of proteins: science and technology. In: R. G. Harrison (Ed.), *Protein Purification Process Engineering*, pp. 115-208, New York Marcel Dekker Inc

Roy J. J. and T. E. Abraham. 2006. Continuous biotransformation of pyrogallol to purpurogallin using cross-linked enzyme crystals of laccase as catalyst in a packed-bed reactor. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 81: 1836-1839.

Royon, D., M. Daz, G. Ellenrieder and S. Locatelli. 2007. Enzymatic production of Biodiesel from cotton seed oil using t-butanol as a solvent. *Bioresource Technol.* 98: 648-653

Saka, S., and D. Kusdiana. 2001. Biodiesel fuel from rapeseed oil as prepared in supercritical methanol. *Fuel* 80: 225-231

Sakai, S, Y. Liu, T. Yamaguchi, R. Watanabe, M. Kawabe and K. Kawakami. 2010. Production of butyl-biodiesel using lipase physically-adsorbed onto electrospun polyacrylonitrile fibers. *Bioresource Technol.* 101(19): 7344-7349

Salis, A., M. Pinna, M. Monduzzi and V. Solinas. 2008. Comparison among immobilised lipases on macroporous polypropylene toward biodiesel synthesis. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 54(1-2): 19-26

Salis, A., E. Sanjust, V. Solinas and M. Monduzzi. 2005. Commercial lipase immobilization on Accurel MP1004 porous Polypropylene. *Biocatal. Biotransfor.* 23(5): 381-386

Samukawa, T., M. Kaieda, T. Matsumoto, K. Ban, A. Kondo, Y. Shimada, H. Noda and H. Fukuda. 2000. Pretreatment of Immobilized *Candida antarctica* lipase for Biodiesel fuel production from plant oil. *J. Bioresour. Bioeng.* 90: 180–183

Scheib, H., J. Pleiss, P. Stadler, A. Kovac, A. P. Potthoff, L. Haalck, F. Spener, F. Paltauf and R. D. Schmid. 1998. Rational design of *Rhizopus oryzae* lipase with modified stereoselectivity toward triradylglycerols. *Protein Eng.* 11: 675-682

Schoevaart, R., M. W. Wolbers, M. Golubovic, M. Ottens, A. P. Kieboom and F. van Rantwijk. 2004. Preparation, optimization, and structures of crosslinked enzyme aggregates (CLEAs). *Biotechnol. Bioeng.* 87: 754–762

Schoevaart, R., W. R. Klaas, L. M. van Langen, R. T. van Den Dool, and J. W. Boumans. 2008. Method for the Preparation of Cross-Linked Enzyme Aggregates with Improved Properties. *United States Patent Application 20080296231*

Schwab, A. W., M. O. Bagby and B. Freedman. 1987. Preparation and properties of diesel fuels from vegetable oils. *Fuel* 66: 1372-1378

Shah, S., S. Sharma and M. N. Gupta. 2004. Biodiesel Preparation by Lipase-Catalyzed Transesterification of *Jatropha* Oil. *Energ. Fuel*. 18: 154-159

Shah, S., A. Sharma and M. N. Gupta. 2006. Preparation of cross-linked enzyme aggregates by using bovine serum albumin as a proteic feeder. *Anal. Biochem.* 351: 207–213

Shao P., X. Meng, J. He and P. Sun. 2008. Analysis of immobilized *Candida rugosa* lipase catalyzed preparation of biodiesel from rapeseed soapstock. *Food Bioprod. Process.* 86(4): 283-289.

Sheldon, R. A. 2007. Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs): stable and recyclable biocatalysts. *17th International Conference on Protein Stabilization* 1583-1587.

Shimada, Y., Y. Watanabe, T. Samukawa, A. Sugihara, H. Noda, H. Fukuda and Y. Tominaga. 1999. Conversion of vegetable oil to biodiesel using immobilized *Candida antarctica* lipase, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 76(7): 789–793

Shimada, Y., Y. Watanabe, A. Sugihara and Y. Tominaga. 2002. Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 17: 133-142

Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goetze, B. J. Olson, D. C. Klenk. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150(1): 76-85

Straathof, A. J. J., S. Panke and A. Schmid. 2002. The production of fine chemicals by biotransformations. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13:548-556

Su, E. and D. Wei. 2008. Improvement in lipase-catalyzed methanolysis of triacylglycerols for biodiesel production using a solvent engineering method. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 55: 118–125

Sugihara, A., M. Ueshima, Y. Shimada, S. Tsunasawa and Y. Tominaga. 1992. Purification and characterization of a novel thermostable lipase from *Pseudomonas cepacia*. *J. Biochem.* 112: 598-603

- Tan, T., J. Lu, K. Nie, L. Deng and F. Wang. 2010. Biodiesel production with immobilized lipase: A review. *Biotechnol. Adv.* doi:10.1016/j.biotechadv.2010.05.012
- Teng, Y. and Y. Xu. 2007. A modified par-nitrophenyl palmitate assay for lipase synthetic activity determination in organic solvent. *Anal. Biochem.* 363: 297-299
- Tischer, W. and V. Kasche. 1999. Immobilized enzymes: crystals or carriers?. *Trends Biotechnol.* 17:326-335.
- Tüchsen, E. and M. Ottesen. 1977. Kinetic properties of subtilisin type Carlsberg in the crystalline state. *Carlsberg Res. Commun.* 42:407-420
- Van Gerpen, J. and G. Knothe. 2005. Biodiesel Production. In: Knothe, G., J. van Gerpen and J. Krahl (Eds.), *The Biodiesel Handbook*, 303 pp. Champaign, Illinois AOCS Press
- Verger, R. 1997. Interfacial activation of lipases: Facts and artifacts. *Trends Biotechnol.* 15: 32-38
- Wang J. X., Huang Q. D., Huang F. H., Wang J. W., Huang Q. J. 2007. Lipase-catalyzed Production of Biodiesel from High Acid Value Waste Oil Using Ultrasonic Assistant. *Chin. J. Biotech.* 23(6): 1121-1128
- Wassell, C. S. and T. P. Dittmer. 2006. Are subsidies for biodiesel economically efficient?. *Energ. Policy* 34: 3993-4001
- Wiechelman, K. J., R. D. Braun and J. D. Fitzpatrick. 1988. Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: Identification of the groups responsible for color formation. *Anal. Biochem.* 175 (1): 231-237
- Wilson, L., G. Fenández-Lorente, R. Fernández-Lafuente, A. Illanes, J. M. Guisán and J. M. Palomo. 2006. CLEAs of lipases and poly-ionic polymers: A simple way of preparing stable biocatalysts with improved properties. *Enzyme Microb. Tech.* 39: 750-755
- Wong S. 1993. Homobifunctional Cross-Linking Reagents. In: S. Wong (Ed.), *Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking*, pp. 75-103. London CRC Press
- Xu, Y., W. Du, D. Liu and J. Zeng. 2003. A novel enzymatic route for biodiesel production from renewable oils in a solvent-free medium. *Biotechnol. Lett.* 25: 1239-1241

Xu, Y., W. Du, J. Zeng and D. Liu. 2004. Conversion of soyabean oil to biodiesel fuel using lipozyme TL IM in a solvent free medium. *Biocatal. Biotransform.* 22: 45-48

Xu, Y., X. Du and D. Liu. 2005. Study on the kinetics of enzymatic interesterification of triglycerides for biodiesel production with methyl acetate as the acyl acceptor. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 32: 241-245

Yagiz, F., D. Kazan and A. N. Akin. 2007. Biodiesel production from waste oils by using lipase immobilized on hydrotalcite and zeolites. *Chem. Eng. J.* 134: 262-267

Yang, G., T. Tian-Wei, N. Kai-Li, and W. Fang. 2006. Immobilization of Lipase on Macroporous Resin and Its Application in Synthesis of Biodiesel in Low Aqueous Media. *Chin. J. Biotech.* 22(1): 114-118

Zaks, A. 1996. New enzymatic properties in organic media. In: Koskinen, A. M. P. and A. M. Klivanov (Eds.), *Enzymatic reactions in organic media*, pp. 81-84. London Chapman & Hall

Zeng, J., W. Du, X. Y. Liu, D. H. Liu and L. M. Dai. 2006. Study on the effect of cultivation parameters and pretreatment on *Rhizopus oryzae* cell-catalized transesterification of vegetable oils for biodiesel production. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 43: 15-18.

Ziejewski, M., K. R. Kaufman, A. W. Schwab and E. H. Pryde. 1984. Diesel engine evaluation of a non-ionic sunflower oil-aqueous ethanol microemulsion. *J. Am. Oil Cem. Soc.* 61: 1620-1626.

Anexos

Índice Apéndices

	Página
Anexo 1: Curva de calibrado y ejemplo de cálculo de actividad de síntesis.....	127
Anexo 2: Curva de calibrado y ejemplo de cálculo de actividad de hidrólisis.....	128
Anexo 3 Curva de calibrado y ejemplo de cálculo de concentración de proteína.....	129
Anexo 4 Ejemplos de imágenes microscópicas de CLEAs.....	131
Anexo 5 Cuantificación de acilglicéridos mediante GC.....	133
Anexo 6 Cromatogramas para la cuantificación de acilglicéridos.....	135
Anexo 7 Polimerización de glutaraldehído.....	137
Anexo 8 Cuantificación del porcentaje de actividad residual de hidrólisis de la suspensión y actividad residual en el CLEA al ser sometido a 60°C durante 50h.....	138
Anexo 9 Cálculo de ácidos grasos libres.....	139
Anexo 10 Análisis de varianza (ANOVA) para el diseño central compuesto en función de distintas respuestas.....	140
Anexo 11 Ejemplo de cálculo de ofrecimiento de grupos aldehído/grupos amino.....	143
Anexo 12 Cálculo del Índice de yodo del aceite de raps canola.....	146

Anexo 1: Curva de calibrado y ejemplo de cálculo de actividad de síntesis.

- Curva de calibrado para la actividad de síntesis:

$$\text{Absorbancia}_{(410\text{nm})} = 14,814 \cdot [\text{pNP}] + 0,0013 \quad R^2 = 0,9988$$

Donde,

Absorbancia_(410nm): Pendiente de la medición de actividad (Abs)

[pNP]: Concentración de pNP respecto al tiempo (mM)

- Ejemplo de cálculo:

Esta medición de actividad se realiza midiendo la absorbancia a diferentes tiempos según metodología 3.2.1. Para cada absorbancia se calcula una concentración de pNP según la curva de calibrado y luego se grafica la concentración de pNP versus el tiempo que corresponde a cada concentración, obteniendo así el valor de la pendiente en el rango lineal.

$$\text{Pendiente} = 0,008 \frac{\text{mM}}{\text{min}}$$

Datos usados para la medición de la actividad

$$\text{Masa}_{\text{CLEA}} = 2\text{mg}$$

$$\text{Volumen}_{\text{reacción}} = 1,06\text{mL}$$

$$\text{Volumen}_{\text{muestra}} = 0,025\text{mL}$$

$$\text{Volumen}_{\text{medición}} = 1,025\text{mL}$$

$$\text{Act.}_s = \left(0,008 \cdot \left(\frac{1,06}{2} \right) \cdot \left(\frac{1,025}{0,025} \right) \cdot 1000 \right) \frac{\mu\text{moles pNP}}{\text{min} \cdot \text{g}_{\text{CLEA}}} = 173,84 \frac{U_s}{\text{g}_{\text{CLEA}}}$$

Anexo 2: Curva de calibrado y ejemplo de cálculo de actividad de hidrólisis.

- Curva de calibrado para actividad de hidrólisis:

$$Absorbancia_{(348nm)} = 5,0402 \cdot [pNP] + 0,0068 \quad R^2 = 0,998$$

Donde,

Absorbancia_(348nm): Pendiente de la medición de actividad (Abs/min)

[pNP]: Concentración de pNP respecto al tiempo (mM/min)

- Ejemplo de cálculo:

De la medición de la actividad se obtiene la siguiente pendiente

$$Absorbancia_{(348nm)} = 0,1 \frac{Absorbancia}{min}$$

Usando la curva de calibrado y la pendiente anterior se calcula el siguiente valor

$$[pNP] = 0,0185 \frac{mM}{min}$$

Datos usados para la medición de la actividad

$$[CLEA] = 10 \frac{g}{L}$$

$$Volumen_{enzima} = 0,1 mL$$

$$Volumen_{total} = 2,55 mL$$

$$Act_{\cdot H} = \left(0,0185 \cdot \left(\frac{2,55}{0,1} \right) \cdot \left(\frac{1000}{10} \right) \right) \frac{\mu moles \ pNP}{min \cdot g} = 47,18 \frac{U_H}{g_{CLEA}}$$

Anexo 3 Curva de calibrado y ejemplo de cálculo de concentración de proteína.

- Concentración de proteína mediante método del ácido bicinconínico (BCA)

$$Absorbancia_{(562nm)} = 0,0012 \cdot [Proteína] + 0,0294 \quad R^2 = 0,9926$$

Donde,

Absorbancia_(562nm): Absorbancia de la muestra a 562nm

[Proteína]: Concentración de proteína (µg/ml)

- Ejemplo de cálculo del porcentaje de proteína en el biocatalizador sólido:

$$Suspensión_{CLEA} = 5 \frac{mg}{mL}$$

$$Volumen_{suspensión_{CLEA}} = 0,05 mL$$

$$Absorbancia_{(562nm)} = 0,672$$

Con la absorbancia se calcula la concentración de proteína en la muestra (suspensión de CLEA), obteniendo el siguiente valor:

$$[Proteína] = 500 \frac{\mu g}{mL}$$

Con este valor se calcula la masa de proteína en la muestra:

$$masaproteína = \frac{500 \cdot 0,05}{1000} = 0,025 mg$$

Luego se calcula la masa de biocatalizador en la muestra de la siguiente forma:

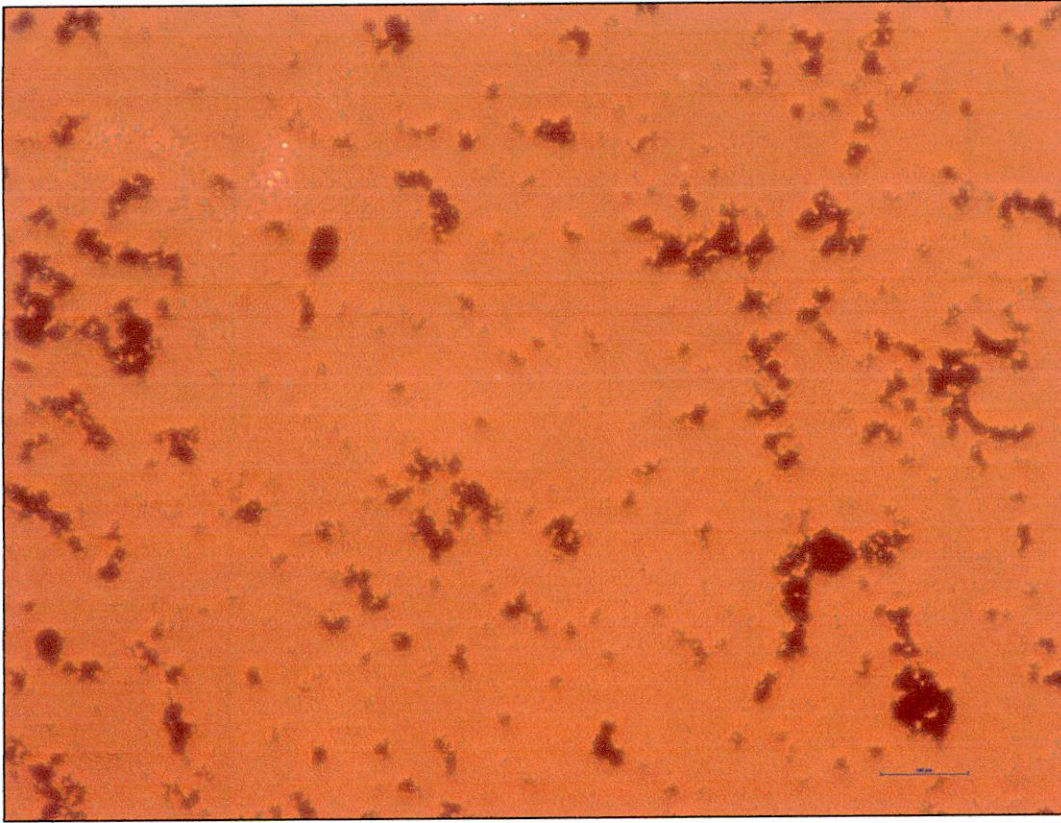
$$masa_{CLEA} = 5 \cdot 0,05 = 0,025mg$$

De esta forma tenemos que una masa de CLEA de 0,25mg contiene 0,025mg de proteína.

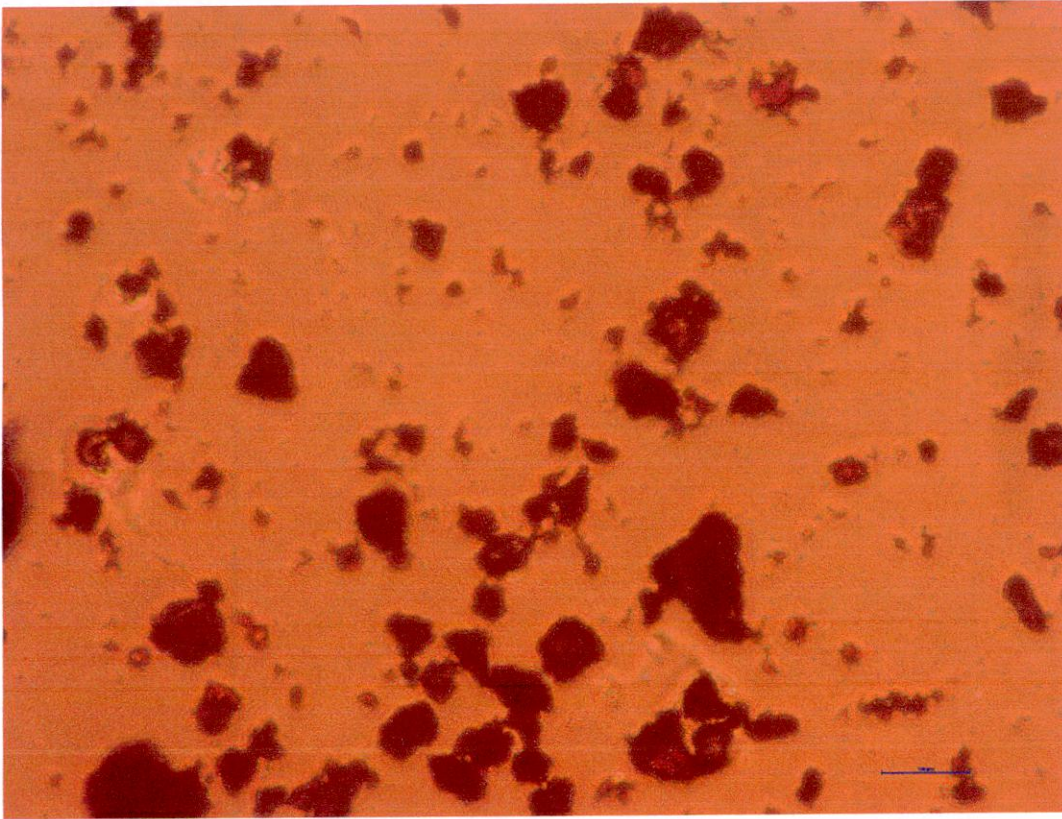
Luego, el porcentaje de proteína en el CLEA se calcula de la siguiente forma:

$$\%proteína_{CLEA} = \frac{0,025 \cdot 100}{0,25} = 10\%$$

Anexo 4 Ejemplos de imágenes microscópicas de CLEAs



Fotografía de microscopía óptica de CLEA preparado con glutaraldehído a pH 2,8, concentración de glutaraldehído de 25mM y razón enzima/albúmina de 10. La barra azul en la esquina inferior derecha indica una distancia 100 μ m. De acuerdo al programa Image Tool, el tamaño de partícula de los CLEA mostrados es de 24,7 \pm 9 μ m.



Fotografía de microscopía óptica de CLEA preparado con glutaraldehído a pH 11,2, concentración de glutaraldehído de 25mM y razón enzima/albúmina de 10. La barra azul en la esquina inferior derecha indica una distancia 100 μ m. De acuerdo al programa Image Tool, el tamaño de partícula de los CLEA mostrados es de 55,4 \pm 18,9 μ m.

Anexo 5 Cuantificación de acilglicéridos mediante GC

M_{MG} : Masa monooleina (mg)

M_{DG} : Masa dioleina (mg)

M_{TG} : Masa trioleina (mg)

M_{TC} : Masa estándar interno de tricaprina (mg)

M_m : Masa de muestra (mg)

A_{MG} : Área cromatográfica monooleina ($\mu V*s$)

A_{DG} : Área cromatográfica dioleina ($\mu V*s$)

A_{TG} : Área cromatográfica trioleina ($\mu V*s$)

A_{TC} : Área cromatográfica estándar interno de tricaprina ($\mu V*s$)

- Curvas de calibrado:

Curva calibrado monooleina:

$$\frac{M_{MG}}{M_{TC}} = 0,5556 \cdot \left(\frac{A_{MG}}{A_{TC}} \right) - 0,3098 \quad R^2 = 0,9986$$

Curva calibrado dioleina:

$$\frac{M_{DG}}{M_{TC}} = 0,8037 \cdot \left(\frac{A_{DG}}{A_{TC}} \right) + 0,1104 \quad R^2 = 0,9994$$

Curva calibrado trioleina:

$$\frac{M_{TG}}{M_{TC}} = 2,7668 \cdot \left(\frac{A_{TG}}{A_{TC}} \right) + 0,2095 \quad R^2 = 0,9947$$

- Ejemplo de cálculo:

$A_{MG}=2700000$ ($\mu V*s$)

$A_{DG}=700000$ ($\mu V*s$)

$A_{TG}=30000$ ($\mu V*s$)

$M_m= 100$ mg

Concentración tricaprina= 8,26mg/ml

Volumen tricaprina en muestra= 200 μ l

$M_{TC}= 1,652$ mg

$A_{TC}= 600000$ ($\mu V*s$)

De curvas de calibrado se obtienen M_{MG} , M_{DG} y M_{TG} . Con estas masas y la masa de muestra se obtienen los porcentajes en peso de cada acilglicérido de la siguiente forma:

$$\%MG = \left(\frac{M_{MG}}{M_m} \right) \cdot 100 = 3,62\%$$

$$\%DG = \left(\frac{M_{DG}}{M_m} \right) \cdot 100 = 1,73\%$$

$$\%TG = \left(\frac{M_{TG}}{M_m} \right) \cdot 100 = 0,57\%$$

De este modo, la conversión de alquil ésteres de ácidos grasos se calcula de la siguiente forma:

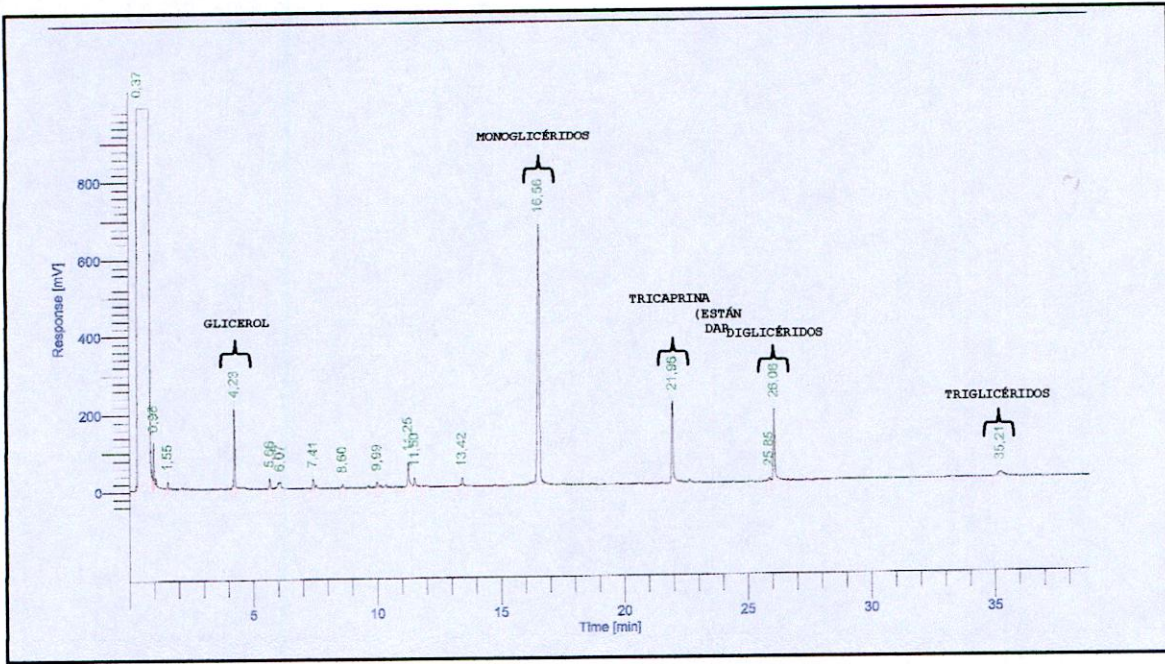
$$\%Conversión = 100 - \%MG - \%DG - \%TG$$

$$\%Conversión = 100 - 3,62 - 1,73 - 0,57 = 94,08\%$$

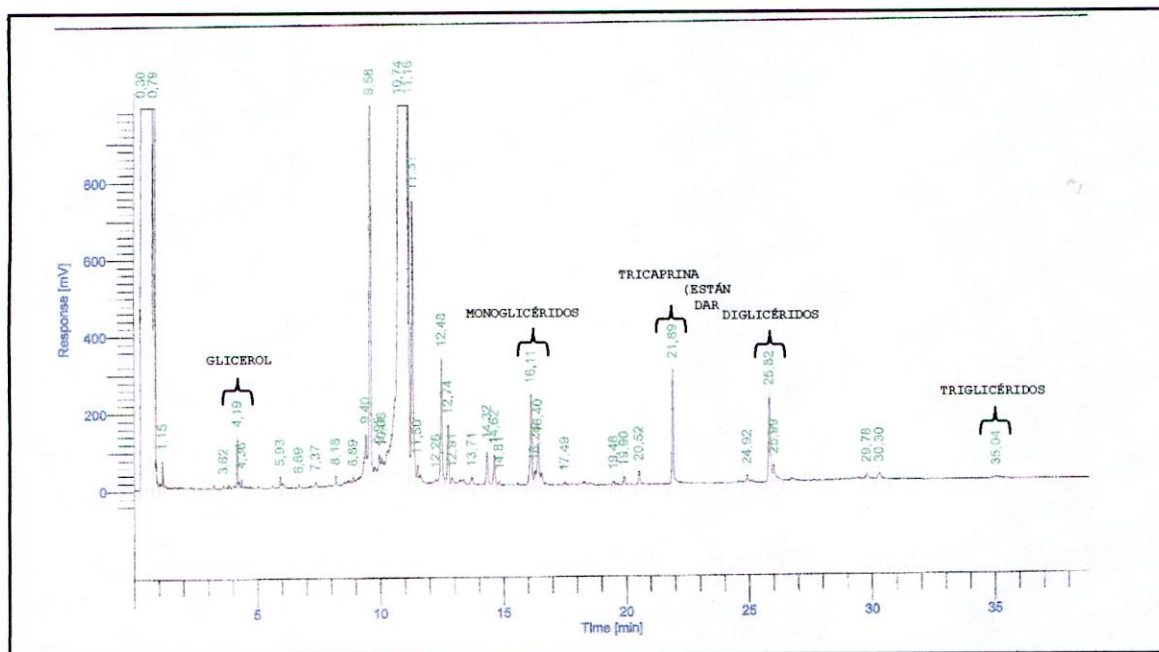
En caso de determinar la conversión exacta de alquil ésteres de ácidos grasos, se debería restar también la presencia de ácidos grasos libres cuantificados mediante la metodología 3.3.10 y calculados según el Anexo 9.

Anexo 6 Cromatogramas para la cuantificación de acilglicéridos

Cromatograma de un punto de la curva de calibrado. Se muestran los tiempos de retención de los acilglicéridos y glicerol.

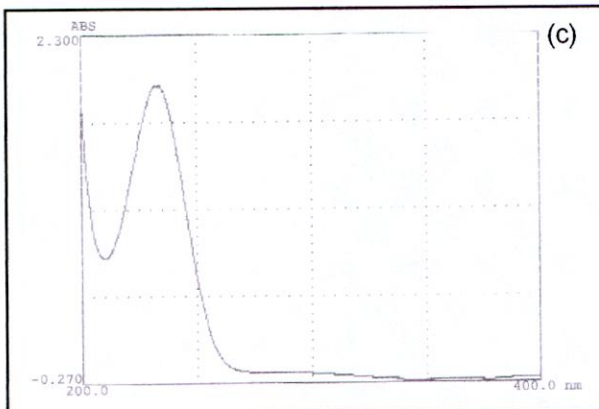
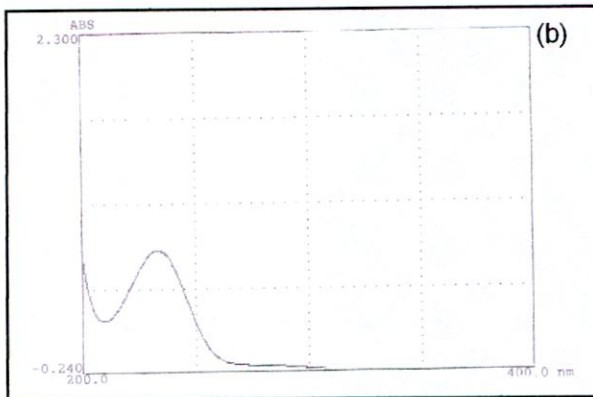
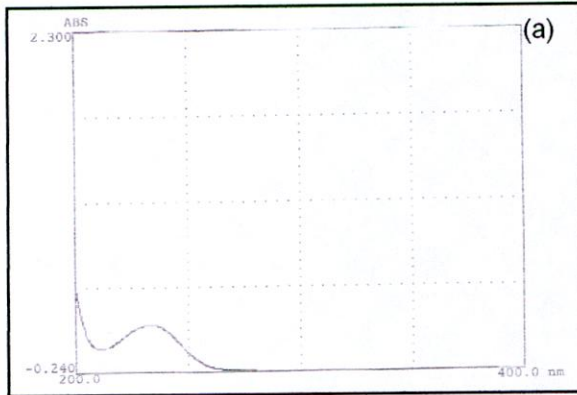


A continuación se presenta una muestra de una reacción para la producción de biodiesel usando como biocatalizador un CLEA de lipasa PS hidrofóbico (PTES-HMDA). La muestra fue tomada a las 20h de reacción y se obtuvo una rendimiento de conversión cercano al 97%p/p.



Anexo 7 Polimerización de glutaraldehído

Según se ha determinado, los polímeros de glutaraldehído poseen un peak de absorbancia a 234nm, por lo que su presencia en una muestra se determina mediante un barrido de longitud de onda entre 200 y 400nm (Margel y Rembaum, 1980). Las figuras (a), (b) y (c) muestran los polímeros de glutaraldehído presentes en las muestras a pH 4,5, pH 7,0 y pH 9,5 respectivamente. Para obtener los perfiles mostrados, se ha empleado un factor de dilución de 500 respecto a las muestras de glutaraldehído al 25%v/v.



Anexo 8 Cuantificación del porcentaje de actividad residual de hidrólisis de la suspensión y actividad residual en el CLEA al ser sometido a 60°C durante 50h

Para la cuantificación del porcentaje de ácidos grasos libres se tiene la siguiente ecuación:

- Porcentaje de actividad de la suspensión:

Suponemos que se empezó la experiencia de estabilidad con una actividad de hidrólisis de 50(U_H/mL_{suspensión}) y luego de 50h a 60°C en medio acuoso medimos la actividad de la suspensión de CLEA según metodología 3.3.7 y obtenemos 40(U_H/mL_{suspensión}). Por lo tanto, luego de 50h conservamos en la suspensión el 80% de la actividad de inicial.

- Porcentaje actividad en el CLEA

Por otra parte, si al final de las 50h centrifugamos y obtenemos que la actividad del sobrenadante es de 15(U_H/mL_{suspensión}), podemos calcular la actividad residual de hidrólisis en el CLEA a las 50h mediante el siguiente cálculo:

$$Act_{H_{CLEA}} = 40 - 15 = 25 \frac{U_H}{mL}$$

Entonces con este valor se calcula el porcentaje de actividad que permanece en el CLEA luego de 50h a 60°C respecto a la actividad inicial:

$$\% Act_{residual50h} = \frac{25 \cdot 100}{50} = 50\%$$

Anexo 9 Cálculo de ácidos grasos libres

Para la cuantificación del porcentaje de ácidos grasos libres se tiene la siguiente ecuación:

$$\%AGL = \frac{V_{NaOH} \cdot [NaOH] \cdot 28,2}{m_M}$$

Donde,

%AGL: porcentaje de ácidos grasos libres en la muestra (%p/p)

VNaOH: volumen de NaOH gastado en la titulación (mL)

[NaOH]: Concentración de NaOH (g/L)

mM: masa de muestra (g)

Si se han gastado 3mL de una solución de NaOH 0,1g/L para titular una muestra de 2,5g, entonces tenemos el siguiente resultado:

$$\%AGL = \frac{3 \cdot 0,1 \cdot 28,2}{2,5} = 3,4\%$$

Anexo 10 Análisis de varianza (ANOVA) para el diseño central compuesto en función de distintas respuestas

Respuesta 1: Actividad de síntesis

Fuente	Suma de cuadrados	grados de libertad	cuadrado promedio	Valor de F	Prob > F	
Modelo	4488,10	3	1496,03	3,69	0,034	significativo
pH	2587,71	1	2587,71	6,38	0,023	significativo
Razón Enzima/Albúmina	0,06	1	0,06	0,00	0,991	
[glutaraldehído]	1900,33	1	1900,33	4,69	0,046	significativo
Residuos	6489,52	16	405,60			
Error puro	24,87	5	4,97			
Suma total de cuadrados corregidos	10977,63	19				

El valor de F del modelo (3,69) implica que el modelo es significativo. Existe solo un 3,4% de posibilidad de que el valor de F del modelo pueda ocurrir debido al ruido. Los valores de Prob>F menores que 0,05 indican que los términos del modelo son significativos. En el presente caso, el pH y la concentración de glutaraldehído son los términos significativos del modelo. Los valores mayores a 0,1 indican que los términos del modelo no son significativos.

Respuesta 2: Actividad de hidrólisis

Fuente	Suma de cuadrados	grados de libertad	cuadrado promedio	Valor de F	Prob > F	
Modelo	6940,28	9	771,14	1,72	0,2039	no significativo
pH (A)	706,95	1	706,95	1,58	0,2372	
Razón Enzima/Albúmina (B)	729,70	1	729,70	1,63	0,2303	
[glutaraldehído] (C)	2099,72	1	2099,72	4,70	0,0554	
AB	1,71	1	1,71	0,00	0,9519	
AC	87,78	1	87,78	0,20	0,6671	
BC	50,50	1	50,50	0,11	0,7438	
A ²	227,64	1	227,64	0,51	0,4918	
B ²	4,56	1	4,56	0,01	0,9215	
C ²	3153,72	1	3153,72	7,05	0,0241	significativo
Residuos	4471,06	10	447,11			
Error puro	11,88	5	2,38			
Suma total de cuadrados corregidos	11411,34	19				

El valor de F del modelo de 1,72 implica que el modelo no es significativo relativo al ruido. Existe un 20% de posibilidades de que el valor de F del modelo sea debido al ruido. Los valores de Prob>F menores que 0,05 indican que los términos del modelo son significativos. En este caso C² es un término del modelo significativo. Valores de Prob>F mayores a 0,1 no son significativos en el modelo.

Respuesta 3: Tamaño de partícula

Fuente	Suma de cuadrados	grados de libertad	cuadrado promedio	Valor de F	Prob > F	
Modelo	4151,69	3	1383,90	7,40	0,0025	significativo
pH	2436,95	1	2436,95	13,03	0,0023	significativo
Razón Enzima/Albúmina	1057,82	1	1057,82	5,66	0,0302	significativo
[glutaraldehído]	656,91	1	656,91	3,51	0,0793	
Residuos	2992,07	16	187,00			
Error puro	30,91	5	6,18			
Suma total de cuadrados corregidos	7143,76	19				

El valor de F del modelo de 7,4 implica que el modelo es significativo. Existe solo un 0,25% de posibilidad de que el valor de F del modelo pudiera ocurrir debido al ruido.

Los valores de Prob>F menores que 0,05 indican que los términos del modelo son significativos. En este caso el pH y la razón enzima/albúmina son los términos significativos del modelo. Los valores mayores a 0,1 indican que los términos del modelo no son significativos. Esto refleja que el término de concentración de glutaraldehído posee cierta significancia, pero no es la variable más importante en la determinación del tamaño de la partícula de los CLEA de lipasa.

Respuesta 4: Porcentaje de actividad de hidrólisis de la suspensión luego de 50h a 60°C

Fuente	Suma de cuadrados	grados de libertad	cuadrado promedio	Valor de F	Prob > F	
Modelo	8786,45	9	976,27	7,10	0,0026	significativo
pH (A)	393,07	1	393,07	2,86	0,1219	
Razón Enzima/Albúmina (B)	350,23	1	350,23	2,55	0,1417	
[glutaraldehído] (C)	2203,00	1	2203,00	16,01	0,0025	significativo
AB	15,96	1	15,96	0,12	0,7404	
AC	85,15	1	85,15	0,62	0,4497	
BC	1708,20	1	1708,20	12,42	0,0055	significativo
A ²	1641,44	1	1641,44	11,93	0,0062	significativo
B ²	213,48	1	213,48	1,55	0,2413	
C ²	2730,97	1	2730,97	19,85	0,0012	significativo
Residuos	1375,84	10	137,58			
Error puro	15,29	5	3,06			
Suma total de cuadrados corregidos	10162,29	19				

El valor de 7,1 del modelo implica que el modelo es significativo. Existe solo un 0,26% de que el valor de F del modelo pueda ocurrir debido al ruido.

Valores de Prob>F menores a 0,05 indican que los términos del modelo son significativos. En este caso, C, BC, A² y C² son los términos significativos del modelo.

Respuesta 5: Porcentaje de actividad en el CLEA luego de 50h a 60°C.

Fuente	Suma de cuadrados	grados de libertad	cuadrado promedio	Valor de F	Prob > F
Modelo	5578,41	9	619,82	9,60	0,0007 significativo
pH (A)	899,74	1	899,74	13,94	0,0039 significativo
Razón Enzima/Albúmina (B)	665,27	1	665,27	10,31	0,0093 significativo
[glutaraldehído] (C)	505,09	1	505,09	7,83	0,0189 significativo
AB	180,50	1	180,50	2,80	0,1254
AC	136,13	1	136,13	2,11	0,1771
BC	1568,00	1	1568,00	24,29	0,0006 significativo
A^2	38,55	1	38,55	0,60	0,4575
B^2	99,29	1	99,29	1,54	0,2432
C^2	1419,99	1	1419,99	22,00	0,0009 significativo
Residuos	645,45	10	64,54		
Error puro	22,11	5	4,42		
Suma total de cuadrados corregidos	6223,86	19			

El valor de F del modelo de 9,6 implica que el modelo es significativo. Existe solo un 0,07% de probabilidad de que el valor de F del modelo pueda ocurrir debido al ruido.

El valor de Prob>F menor a 0,05 indica que los términos del modelo son significativos. En este caso A, B, C, BC y C² son los términos significativos del modelo.

Anexo 11 Ejemplo de cálculo de ofrecimiento de grupos aldehído/grupos amino

Tomando como base 200mg del preparado comercial en polvo de lipasa PS y que la cantidad de proteína del preparado es de 4,7%, tenemos 9,4mg de proteína. Considerando una razón enzima/albúmina de 10 (punto central en los diseños experimentales), se debe adicionar a la preparación de CLEA una cantidad albúmina de 20mg.

Se ha determinado mediante información encontrada en Pubmed, que la cantidad de residuos de lisina (aporte de grupos amino) tanto de la lipasa de *B. cepacia* como de la albúmina es de 7 y 60 respectivamente.

$$PM_{lipasa} = 35000 \text{ g/mol}$$

$$PM_{albúmina} = 60000 \text{ g/mol}$$

Así:

$$\text{moles}_{lipasa} = 0,00027 \text{ mmoles}$$

$$\text{moles}_{albúmina} = 0,00033 \text{ mmoles}$$

Sabemos que tenemos $6,022 \cdot 10^{23}$ moléculas / mol

$$\text{moléculas}_{lipasa} = 1,6 \cdot 10^{17} \text{ moléculas}$$

$$\text{moléculas}_{albúmina} = 2 \cdot 10^{17} \text{ moléculas}$$

$$\text{amino}_{lipasa} = 7 \text{ grupos amino/molécula lipasa}$$

$$\text{amino}_{albúmina} = 60 \text{ grupos amino/molécula albúmina}$$

Finalmente, el ofrecimiento de grupos amino es de:

$$\text{Grupos amino totales} = (7 \cdot (1,6 \cdot 10^{17})) + (60 \cdot (2 \cdot 10^{17})) = 1,32 \cdot 10^{19} \text{ grupos amino}$$

- Glutaraldehído 25%v/v como agente de entrecruzamiento:

Volumenes de solución de glutaraldehído usados: 100, 200 y 300 μl

Volúmenes de glutaraldehído: 25, 50 y 75 μl

Asumiendo que la densidad del glutaraldehído es cercana a 1g/ml, tenemos que:

Masa de glutaraldehído: 25, 50 y 75 mg

PM glutaraldehído= 100 g/mol

$$Masa_{glut} \cdot PM_{glut} = moles_{glut}$$

Por lo tanto, los moles ofrecidos son los siguientes: 0,25; 0,5 y 0,75 mmoles

Por lo tanto, tenemos $1,5 \cdot 10^{20}$, $3 \cdot 10^{20}$ y $4,5 \cdot 10^{20}$ moléculas de glutaraldehído.

Por otra parte, una molécula de glutaraldehído presenta dos grupos aldehído. Así, tendremos $3 \cdot 10^{20}$, $6 \cdot 10^{20}$ y $9 \cdot 10^{20}$ grupos aldehído ofrecidos.

En definitiva podemos determinar las siguientes razones de grupos aldehído/grupos amino.

$$Razón1 = \frac{3 \cdot 10^{20}}{1,32 \cdot 10^{19}} = 22,7 \frac{\text{grupos}_{aldehyde}}{\text{grupos}_{amino}}$$

$$Razón2 = \frac{6 \cdot 10^{20}}{1,32 \cdot 10^{19}} = 45,5 \frac{\text{grupos}_{aldehyde}}{\text{grupos}_{amino}}$$

$$Razón3 = \frac{9 \cdot 10^{20}}{1,32 \cdot 10^{19}} = 68,2 \frac{\text{grupos}_{aldehyde}}{\text{grupos}_{amino}}$$

- Dextrano aldehído como agente de entrecruzamiento:

PM_{dextrano} entre 100000 y 200000 g/mol (considerar promedio de 150000 g/mol)

Solución de dextrano aldehído de 30 g/l

Volúmenes adicionados a la preparación de CLEA: 1,2; 1,6 y 2 ml (correspondientes a una concentración final de 1,7; 2,2 y 2,7 g/l en la elaboración de CLEA).

Masa de dextrano aldehído ofrecida: 36, 48 y 60 mg

De esta forma, los moles ofrecidos son: 0,00024; 0,00032 y 0,0004 mmoles

Para estimar la cantidad de grupos aldehído de cada molécula de dextrano aldehído se puede mencionar que el dextrano aldehído es un polímero del siguiente tipo $(C_6H_{10}O_5)_n$. El peso molecular del monómero es de 162 g/mol.

$$\frac{n^{\circ} \text{moléculas}_{\text{monómeros}}}{\text{molécula}_{\text{dextrano}}} = \frac{150000 \text{ g/mol}}{162 \text{ g/mol}} = 925,9$$

Cada monómero posee 3 grupos aldehído aproximadamente. Así, una molécula de dextrano aldehído puede ofrecer 2777,8 grupos aldehído.

Por otra parte, la cantidad de moléculas de dextrano aldehído ofrecidas se puede estimar multiplicando la cantidad de moles por $6,022 \cdot 10^{23}$ moléculas/mol. Calculando se obtienen las siguientes cantidades: $1,4 \cdot 10^{17}$; $1,9 \cdot 10^{17}$ y $2,4 \cdot 10^{17}$ moléculas.

Finalmente tenemos los siguientes ofrecimientos de grupos aldehído: $4 \cdot 10^{20}$; $5,4 \cdot 10^{20}$ y $6,7 \cdot 10^{20}$ grupos aldehído.

En definitiva podemos determinar las siguientes razones de grupos aldehído/grupos amino.

$$\text{Razón1}' = \frac{4 \cdot 10^{20}}{1,32 \cdot 10^{19}} = 30,3 \frac{\text{grupos}_{\text{aldehído}}}{\text{grupos}_{\text{amino}}}$$

$$\text{Razón2}' = \frac{5,4 \cdot 10^{20}}{1,32 \cdot 10^{19}} = 40,9 \frac{\text{grupos}_{\text{aldehído}}}{\text{grupos}_{\text{amino}}}$$

$$\text{Razón3}' = \frac{6,7 \cdot 10^{20}}{1,32 \cdot 10^{19}} = 50,8 \frac{\text{grupos}_{\text{aldehído}}}{\text{grupos}_{\text{amino}}}$$

Anexo 12 Cálculo del Índice de yodo del aceite de raps canola

Factores de los ácidos grasos insaturados para el cálculo del índice de yodo

Ácidos Grasos	Factor índice de yodo
C16:1	0,9454
C18:1	0,8560
C18:2	1,7237
C18:3	2,6034
C20:1	0,7820
C22:1	0,7198

$$IY = \sum_{i=1}^n AGI_i \cdot F_i$$

Donde,

IY: Índice de Yodo

AGI_i: % de cada ácido graso insaturado

F_i: Factor índice de yodo de cada ácido graso insaturado

Tomando en cuenta los AGI_i de la Tabla 4.8 se calcula el índice de yodo de la siguiente forma.

$$IY = 0,25 \cdot 0,9454 + 61,87 \cdot 0,856 + 19,58 \cdot 1,7237 + 9,18 \cdot 2,6034 + 1,24 \cdot 0,782 + 0,37 \cdot 0,7198$$

$$IY = 112,1$$