



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Facultad de Ciencias

Departamento de Química Orgánica

***APLICACIÓN DE LIPASAS MICROBIANAS PARA LA
PRODUCCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES SIMILARES
AL BIODIÉSEL QUE INTEGRAN LA GLICERINA EN
FORMA DE MONOGLICÉRIDO***

TESIS DOCTORAL

CARLOS LUNA DURÁN

Córdoba, 8 de Junio de 2015

TITULO: *APLICACIÓN DE LIPASAS MICROBIANAS PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES SIMILARES AL BIODIESEL QUE INTEGRAN LA GLICERINA EN FORMA DE MONOGLICERIDO.*

AUTOR: *Carlos Luna Durán*

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2015
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

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



TÍTULO DE LA TESIS:

APLICACIÓN DE LIPASAS MICROBIANAS PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES SIMILARES AL BIODIÉSEL QUE INTEGRAN LA GLICERINA EN FORMA DE MONOGLICÉRIDO

DOCTORANDO/A: Carlos Luna Durán

INFORME RAZONADO DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS

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

Como Directores de esta Tesis Doctoral consideramos que durante el desarrollo de la misma, el doctorando ha progresado bastante en mejorar las habilidades y competencias propias merecedoras de la obtención del título de Doctor, y que el trabajo desarrollado constituye una aportación relevante en el campo de la producción de biocombustibles aplicables a motores diésel convencionales, puros o en mezclas con diésel fósil, sin necesidad de realizar modificación alguna a estos motores. La particularidad de la aportación científica de estas investigaciones está en la ruta enzimática seguida, que permite integrar el glicerol en el biocombustible, aumentando de forma apreciable el rendimiento atómico del proceso. Estas afirmaciones se apoyan en los siguientes puntos:

- 1.- El doctorando ha superado con buen aprovechamiento los créditos correspondientes a la formación teórico-práctica de la parte formativa del Programa de Doctorado de Química Fina (Máster en Química Fina Avanzada).
- 2.- El doctorando ha participado activamente como investigador en el proyecto ENE 2011-27017 sobre "Producción de un nuevo tipo de biodiésel que integra la glicerina, mediante la aplicación

de lipasas”, en el que han participado los departamentos de Química Orgánica, Microbiología y Bioquímica de la Universidad de Córdoba.

3.- Gracias a la producción científica obtenida, consecuencia de las investigaciones de este proyecto, el doctorando ha disfrutado de una beca del ceiA3 para realizar una estancia de 3 meses en un centro internacional de prestigio, como es el "Institut Technische Chemie" en la Universidad Leipzig (Alemania), del 1/11/2014 hasta el 31/1/2015, lo que le permite optar a la obtención de la mención internacional del título de doctor a través de la Escuela Internacional de Doctorado en Agroalimentación eidA3

4.- Así mismo, ha realizado una estancia de 2 meses, del 3 de febrero al 20 de Marzo del 2014, en el Departamento de Genética de la Universidad de Sevilla, donde adquirió diversas técnicas relativas al manejo de microorganismos y obtención de extractos enzimáticos, aplicadas en la realización de su tesis doctoral.

5.- Ha sido seleccionado para disfrutar de una Beca otorgada por el Servicio Alemán de Intercambio Académico DAAD ("Deutscher Akademischer Austausch Dienst"), otorgada por un comité de selección compuesto por académicos independientes, para un estudio intensivo del idioma Alemán en Marburg, Alemania durante 8 semanas (194 horas lectivas) para el nivel B2 en el curso "S + W speak + write en Marburg" (1 Septiembre-24 Octubre 2014).

6.- También ha realizado una estancia de 3 semanas en BIOENERGY 2020+/TU en la Universidad de Graz (Austria), financiada por el programa europeo BRISK ("Biofuels Research Infrastructure for Sharing Knowledge"), desde el 28/06/2015 hasta el 19/07/2015.

7.- El doctorando ha adquirido una sólida formación en las diversas técnicas instrumentales y metodologías que han sido utilizadas durante el desarrollo de la extensa labor experimental asociada a la realización de esta Tesis Doctoral.

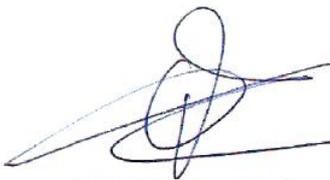
8.- Como resultado de la labor desarrollada directamente relacionada con esta Tesis Doctoral, se han presentado 11 comunicaciones en congresos nacionales, 16 en congresos internacionales, 2 capítulos de libro y 10 artículos en revistas científicas de elevado índice de impacto. En este sentido indicar que en el Congreso de la Federación Española de Biotecnólogos, "BIOTECH ANNUAL CONGRESS 2013", celebrado en Sevilla, obtuvo el Premio del Jurado del Concurso de Pósters "Biotech Meeting Point". Dicho premio respondió, a juicio del Jurado, a la aplicabilidad del trabajo, complejidad de su ejecución y organización práctica del mismo.

9.- En lo que respecta a los resultados obtenidos en las investigaciones realizadas, hay que indicar que suponen un importante avance en la posibilidad de obtener, de forma económicamente viable, un nuevo tipo de biocombustible que integra la glicerina, dado que se ha accedido a nuevos biocatalizadores lipásicos capaces de obtener de forma muy económica, por etanolisis enzimática, mezclas de ésteres etílicos de ácidos grasos y sus monoglicéridos, que constituyen el biocombustibles denominado Ecodiésel.

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

Córdoba, 8 de Junio de 2015

Firma de los directores



Fdo.: Diego Luna Martínez



Fdo.: Felipa M.ª Bautista Rubio



Fdo.: Cristóbal Verdugo Escamilla

D. Antonio Ángel Romero Reyes, Director del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Córdoba.

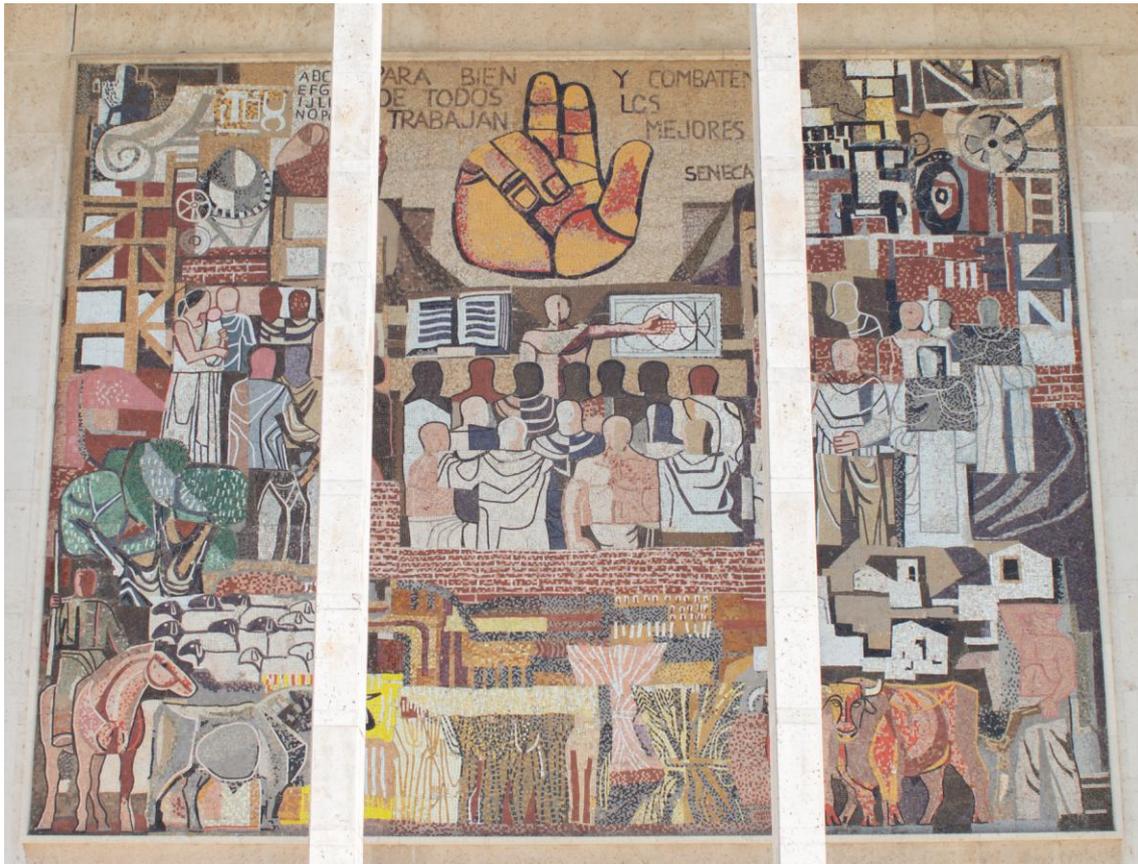
CERTIFICA:

Que el presente Trabajo de Investigación titulado "**APLICACIÓN DE LIPASAS MICROBIANAS PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES SIMILARES AL BIODIÉSEL QUE INTEGRAN LA GLICERINA EN FORMA DE MONOGLICÉRIDO**" que constituye la Memoria presentada por D. Carlos Luna Durán para optar al Grado de Doctor por el Programa de Doctorado de Química Fina, ha sido realizado en los laboratorios del Departamento de Química Orgánica, bajo la dirección de los profesores Dres. D. Diego Luna Martínez, Dña. Felipa M^a Bautista Rubio y D. Cristóbal Verdugo Escamilla.

Y para que conste, firmo el presente certificado en Córdoba a 8 de Junio de 2015.



Fdo: D. Antonio Ángel Romero Reyes



Joaquín Vaquero Turcios. *La Creación y el Trabajo* (1956)

"No nos atrevemos a muchas cosas porque son difíciles, pero son difíciles porque no nos atrevemos a hacerlas".

Lucio Anneo Séneca (2 AC-65). Filósofo latino

"Intenta no volverte un hombre de éxito, sino volverte un hombre de valor"

Albert Einstein (1879-1955). Premio Nobel de Física



Amadeo Gabino. Hombre y niño (1952)

AGRADECIMIENTOS

Parece que fue ayer cuando una semana después de haber comprobado que había aprobado los últimos exámenes de la Licenciatura de Farmacia, me incorporaba a realizar un trabajo de investigación en el Departamento de Química Orgánica y en el Departamento de Microbiología, de la UCO. Mi padre, Profesor Diego Luna, como investigador principal del proyecto ENE 2011-27017 sobre “Producción de un nuevo tipo de biodiésel que integra la glicerina mediante la aplicación de lipasas” me ofrecía la posibilidad de optar a un contrato asociado al mismo, con el objetivo de realizar el Máster científico de Química Fina y el doctorado en dicho programa, que con este trabajo finaliza. También agradecer a los proyectos que han permitido desarrollar las investigaciones realizadas durante esta tesis doctoral, Proyectos de excelencia de la Junta de Andalucía y Fondos FEDER (FQM 0191, P11-TEP-7723, P09-FQM-478), y Proyectos del Ministerio de Economía y Competitividad (ENE 2011-27017, CTQ2010-1826 y CTQ2011-28954-C02-02).

Muchas son las vivencias, experiencias, aprendizajes compartidos con numerosas personas durante este periodo o ciclo que termina, a las que me gustaría nombrar, citar o recordar a modo de agradecimiento. Pues a través de esta meta que parecía tan lejana, me ha permitido progresar profesionalmente como científico, además de una forma integral en todas las dimensiones de mi persona, sentando unas sólidas bases o cimientos para mi futuro desarrollo como científico investigador y en la vida en general.

Primeramente agradecer a los “compas”, doctorandos y doctorados del departamento, con los cuales siempre he compartido un trato de mutuo respeto y afable compañerismo, *Alfonso, Alejandro, Carmen, Checa, Elena, Fátima, Fran, Gema, Francisco (“Kaquisco”), Lucrecia, Manolos, Marisa, Rafas, Susana y Vicente*. Gracias *Jesús Hidalgo* por esas primeras orientaciones y explicaciones sobre el Cromatógrafo, ese aparato desconocido para mí hasta que empecé esta tesis, ahora imprescindible y diario. También, a *Juan*, compañero investigador contratado del proyecto y sobre todo “cuñado”, y a *Alejandro*, doctorando y gerente de “Seneca Green Catalysis”, ambos

compañeros y coautores de publicaciones. A los doctorandos y profesores del departamento de Genética de la Universidad de Sevilla (US), que facilitaron mi estancia allí, y con la que pude mejorar mi formación en las técnicas de cultivo de microorganismos y obtención de extractos enzimáticos, *Almudena, Leyre*, profesores *avid Cánovas* y *Encarnación Mellado*, gracias a todos y por todo. "Thanks also to the members of the Institute of Chemical Technology, who make all to enable me a great stay there, especially to *Chen Zhihao, Nicole Wilde* and Professor *Glässer*"; "Dankeschön für alles". En este sentido, agradecer al Dr. *Rafael Luque* las gestiones del contacto que realizó para posibilitar mi estancia investigadora, también a la Dra. *Alina Balu*, siempre tan simpática y al doctorando internacional *Majd Al-Naji*, "you have a partner and friend in Córdoba". Agradecer también a las Dras. *Victoria Gascón* y *Rosa M. Blanco*, del Instituto de Catálisis y Petroleoquímica (CSIC), por su disposición a trabajar en colaboración y compartir sus catalizadores para ser testados en la producción de Ecodiésel. A mis amigos y compañeros doctorandos, de la US, *Julio, Fernando* y *Dani*; de la UCO, *Andrés* del depto. de Microbiología. A todos los compañeros del Máster, cursos y congresos, con los que hemos vivido tan buenos momentos. A los amigos y contactos de las RRSS, en especial a los contactos del portal "Research Gate", tan útil para la ciencia e investigación. Por supuesto, agradecer especialmente a mis amigos, *Luis Miguel* ("Tuty"), por las excelentes fotografías que adornan el presente trabajo y *Francisco* ("Currito"), por su localización, todas en el interior del Campus de Rabanales y su descripción a pie de foto.

Agradecer a mis directores de tesis, profesor *Diego Luna*, y padre al mismo tiempo, para bien y para mal. La profesora *Felipa M^a Bautista*, que me ha visto crecer, directora también del proyecto de innovación docente en el que participé y al Dr. *Cristóbal Verdugo*, que nos ha solucionado siempre todo tipo de dudas. Todos excelentes mentores, con los que compartimos trabajo científico y publicaciones. Agradecer también al profesor *Enrique D. Sancho* que me facilitó desarrollar mi trabajo investigador en las instalaciones del departamento de Microbiología y que fue co-

Director de mi TFM del Máster de Química Fina y que me ha dirigido la tesis hasta su jubilación. De alguna forma, moralmente lo considero también como Director de mi Tesis, aunque no pueda serlo efectivamente desde el punto de vista administrativo.

Por supuesto, agradecer a todo el personal del departamento de Química Orgánica y Microbiología, profesores y PAS, a *Rafa* y *Pablo*, tan competentes siempre. Especialmente, agradecimientos para el profesor D. *José María Marinas*, director del grupo de investigación, aprovecho para agradecerle ahora los cochecitos de juguete que me regalaba cuando era pequeño. Así como a los profesores *Francisco J. Urbano* y *Antonio A. Romero*, directores del departamento durante mi estancia en el mismo y el transcurso de mi tesis.

Finalmente, dedicar este trabajo de tesis, a mi familia, que siempre han estado ahí, igualmente yo para ellos. Mis padres, agradecerles todo lo que han hecho por mí, mis hermanos y mis sobrinos. Gracias por haberme educado y ayudarme a conformarme como persona de una forma tan convenientemente, muy responsables lógicamente de todo lo que soy. Siempre me habéis animado, orientado y motivado con vuestro mejor criterio. A mis hermanos, *Miguel* y sobrinos, *Ayla* y *Sauco*, con la distancia nos vemos menos de lo que nos gustaría y mi hermana *Eva*, que ya mismo será una estupenda arquitecta. A todos los titos y primos, nos queremos. En especial con mucho cariño a mis abuelos, vidas ejemplares, tanto a la abuela *Cloti*, espero que siga tan estupenda como ahora y a mis abuelos, *Francisco* y *Josefita*, siempre os recuerdo con mucho amor.

Gracias, salud y amor para todos y todas.



Amadeo Gabino. Hombre (1952)

o. ÍNDICE, OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

Contenido

AGRADECIMIENTOS.....	11
0. ÍNDICE, OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	17
RESUMEN	25
SUMMARY.....	29
OBJETIVOS.....	33
PLAN DE TRABAJO	37
1. INTRODUCCIÓN	43
1.1. SITUACIÓN ACTUAL DE LOS BIOCOMBUSTIBLES.....	45
1.2. BIODIÉSEL: CONCEPTO, PERSPECTIVAS Y TECNOLOGÍAS PARA SU PRODUCCIÓN	57
1.3. PROBLEMATICA ACTUAL PARA LA PRODUCCIÓN INDUSTRIAL DEL BIODIÉSEL CONVENCIONAL	64
1.3.1 FORTALEZAS Y DEBILIDADES EN LA PRODUCCIÓN INDUSTRIAL DEL BIODIÉSEL CONVENCIONAL.	64
1.3.2. ALTERNATIVAS TECNOLÓGICAS EN ESTUDIO PARA ATENUAR LOS EXCEDENTES DE GLICEROL OBTENIDOS EN LA PRODUCCIÓN INDUSTRIAL DE BIODIÉSEL.	72
1.4. BIOCOMBUSTIBLES SIMILARES AL DIÉSEL FOSIL: "GREEN DIESEL"	79
1.5. LIPASAS.....	86

ÍNDICE

1.5.1. ESTRUCTURA DE LAS LIPASAS.....	90
1.5.2. MECANISMO DE REACCIÓN DE LAS LIPASAS.....	94
1.5.3. ESPECIFICIDAD DE LAS LIPASAS.	94
1.5.4. VERSATILIDAD CATALÍTICA DE LAS LIPASAS.....	106
1.5.5. APLICACIONES DE LAS LIPASAS.	114
1.5.6. PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LIPASAS.	115
1.5.7. PREPARACIONES DE BIOCATALIZADORES.....	117
1.6. PRODUCCIÓN ENZIMÁTICA DE BIODIÉSEL	121
1.6.1. APLICACIÓN DE CÉLULAS ENTERAS (LIPASAS INTRACELULARES) INMOVILIZADAS.	126
1.6.2. TRANSESTERIFICACIÓN ENZIMÁTICA CON MATERIAS PRIMAS DE BAJO COSTO Y RICAS EN ÁCIDOS GRASOS LIBRES.....	131
1.6.3. ANÁLISIS TECNO-ECONÓMICO Y CICLO DE VIDA DE LA PRODUCCIÓN ENZIMÁTICA DE BIODIÉSEL.....	134
1.6.4. ESCALADO EN LA PRODUCCIÓN ENZIMÁTICA DE BIODIÉSEL.	140
1.7. BIOCOMBUSTIBLES QUE INTEGRAN LA GLICERINA EN FORMA DE DERIVADOS ACILADOS.	142
1.7.1. BIOCOMBUSTIBLES QUE INTEGRAN EL GLICEROL EN FORMA DE TRIACETATO DE GLICEROL.	146
1.7.2. BIOCOMBUSTIBLES QUE INTEGRAN EL GLICEROL EN FORMA DE CARBONATO DE GLICEROL.	149
1.7.3. BIOCOMBUSTIBLES QUE INTEGRAN EL GLICEROL EN FORMA DE MONOGLICÉRIDOS.	154

ÍNDICE

1.8. FUTURAS PERSPECTIVAS EN LA PRODUCCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES.	160
1.8.1. RETOS FUTUROS PARA EL DESARROLLO DE LOS BIOCOMBUSTIBLES.	160
1.8.2. PERSPECTIVAS FUTURAS EN EL DESARROLLO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA, NECESARIA PARA IMPLEMENTAR LA PRODUCCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES.....	168
1.9. REFERENCIAS	172
2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	197
2.1. MÉTODOS DE ANÁLISIS.	200
2.1.1. METODOS DE ANÁLISIS DE LAS MATERIAS PRIMAS.....	205
2.1.2. DISEÑO EXPERIMENTAL: REACCIONES DE ETANOLISIS.	208
2.1.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE REACCIÓN.	210
2.2. SISTEMAS BIOCATALÍTICOS EMPLEADOS.....	220
2.2.1. LIPOPAN 50 BG	220
2.2.2. CALB (<i>Candida antarctica</i> tipo B).....	222
2.2.3. CEPAS MICROBIANAS SILVESTRES.	245
2.3. ANÁLISIS Y OPTIMIZACIÓN DE LOS PRINCIPALES PARÁMETROS DE REACCIÓN.	253
2.3.1. LIPOPAN 50 BG	254
2.3.2. CALB: Lipasa N435.....	255
2.4. REFERENCIAS	258

ÍNDICE

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES	263
3.1. LIOPAN.	265
3.1.1. Optimización de las condiciones de reacción de la etanolisis enzimática para la obtención de Ecodiésel.	265
3.2. CALB. (Lipasa tipo B de <i>Candida antarctica</i>).	270
3.2.1. NOVOZYM 435 (N435)	270
3.2.2. CALB INMOVILIZADA EN FORMA NO COVALENTE. (mediante adsorción física)	300
3.2.3. CEPA ESTÁNDAR DE <i>CANDIDA ANTARCTICA</i> DE LA C.E.C.T.	304
3.3. CEPAS MICROBIANAS SILVESTRES.	319
3.3.1. CEPAS MICROBIANAS SILVESTRES RECOLECTADAS EN AMBIENTES LIPOFILOS DE ACEITES VEGETALES.....	320
3.3.2. CEPAS MICROBIANAS SILVESTRES RECOLECTADAS EN AMBIENTES LIPOFILOS DE GRASA ANIMAL.	340
3.4. REFERENCIAS.	364
4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	367
4.1. LIOPAN.	371
4.1.1. Optimización de las condiciones de reacción de la etanolisis enzimática selectiva para obtener Ecodiésel.	371
4.2. CALB. (Lipasa tipo B <i>Candida antarctica</i>).	377
4.2.1. NOVOZYM 435 (N435).	377

ÍNDICE

4.2.2. CALB INMOVILIZADA EN FORMA NO COVALENTE (mediante adsorción física).	411
4.2.3. CEPA ESTÁNDAR DE C. ANTARCTICA DE LA C.E.C.T.	418
4.3. CEPAS MICROBIANAS SILVESTRES.	425
4.3.1. CEPAS MICROBIANAS SILVESTRES RECOLECTADAS EN ACEITE VEGETAL.	425
4.3.2. CEPAS MICROBIANAS SILVESTRES RECOLECTADAS EN AMBIENTES CON GRASA ANIMAL.	447
4.3.2. CEPAS MICROBIANAS SILVESTRES RECOLECTADAS EN AMBIENTES CON GRASA ANIMAL.	463
4.4. DISCUSIÓN GENERAL DE TODOS LOS SISTEMAS LIPÁSICOS INVESTIGADOS ..	479
4.5. REFERENCIAS.	489
5. CONCLUSIONES	495
5. CONCLUSIONS	505
6. ANEXOS	513
6.1. MEMORIA DEL TRABAJO REALIZADO EN LA ESTANCIA PARA LA OBTENCIÓN DE LA MENCIÓN INTERNACIONAL EN EL TÍTULO DE DOCTOR.	515
6.2. PUBLICACIONES.	527
6.2.1. CAPÍTULOS DE LIBRO.	527
6.2.2. ARTÍCULOS EN REVISTAS.	528
6.2.3. COMUNICACIONES Y PONENCIAS PRESENTADAS A CONGRESOS.	532

RESUMEN

Investigaciones anteriores de nuestro Grupo han descrito la obtención de un nuevo tipo de biocombustible alternativo al Biodiésel convencional, denominado ECODIÉSEL, patentado por la universidad de Córdoba. Este biocombustible, al igual que el biodiésel, es aplicable a los motores diésel convencionales pero tiene la particularidad de que integra el glicerol en forma de monoglicérido (MG). Esta innovación se considera muy útil y ventajosa, pues la glicerina aparece como un subproducto en la producción convencional del Biodiésel, que se acumula como excedente industrial, presenta una gestión problemática, ya que su purificación resulta relativamente costosa y las elevadas cantidades producidas no permiten su consumo, como materia prima en la fabricación de productos demandados por el mercado. Esto ha generado que en la actualidad ya se considere esta glicerina más como un residuo que como un producto aprovechable como una materia prima industrial.

Además, su presencia en el biocombustible, aún en cantidades muy pequeñas, es dañina para los motores de combustión, por lo que el proceso de producción de biodiésel convencional incluye un paso adicional de limpieza del biocombustible obtenido, dirigido a la eliminación de la glicerina, hasta unos niveles inferiores al 0.02%, según marcan las normas internacionales de calidad. Así, esta propuesta alternativa, cuánto menos conlleva una importante reducción de los costes del proceso y mejora del rendimiento. El Ecodiésel es obtenido mediante transesterificación enzimática con lipasas 1,3 selectivas: ya sea con la Lipasa Pancreática Porcina (PPL), inicialmente aplicada, o con diversas lipasas microbianas, que se han utilizado recientemente para seguir optimizando este proceso en estudio.

En esta Memoria se recogen los trabajos realizados para avanzar en la optimización de este proceso enzimático, implementando así su viabilidad económica para la aplicación de nuevos biocatalizadores lipásicos en la producción de Ecodiésel. En este sentido, la mayor novedad y progreso previsto en este trabajo es superar el principal problema asociado a la producción enzimática de Biodiésel, derivado del

RESUMEN

elevado costo de las enzimas de elevada pureza hasta ahora empleadas, dado que son complicadas de conseguir a partir de cepas obtenidas por técnicas genéticas y biotecnológicas, y sobre todo de su posterior purificación. Este trabajo de investigación plantea un estudio, evaluación y selección de diferentes lipasas, así como de diferentes sistemas enzimáticos obtenidos a partir de ellas, tanto en forma libre como inmovilizada, muy purificadas comerciales o extractos poco purificados a partir de cepas silvestres, aisladas en medios lipófilos (aceite vegetal y grasa animal). También se prueban extractos procedentes de cepas, de la misma especie que una de las lipasas comerciales más habituales y productivas en este proceso como es la *Candida antarctica* tipo B (CALB) adquiridas en la CECT (Colección Española de Cultivos Tipo), a fin de seleccionar las lipasas o sistemas enzimáticos más eficaces, para optimizar la producción del biocombustible indicado, así como su desarrollo biotecnológico, para su futura aplicación a escala comercial, a fin de posibilitar el desarrollo tecnológico de un sistema sostenible de producción de biocombustibles.

SUMMARY

SUMMARY

Previous research works from our group have described the production of a new type of alternative biofuel to conventional biodiesel, called ECODIESEL, patented by the University of Cordoba. This new proposed biofuel, like the conventional biodiesel, is applicable to conventional diesel engines, but it has the particularity that integrates the glycerol as monoglyceride (MG). This innovation is considered very useful and advantageous, because the glycerol appears as a byproduct in the production of conventional biodiesel, which accumulates as an industrial excess. Besides, it has a problematic management because its purification is relatively expensive and the high quantities produced do not allow its consumption, as raw material in the manufacture of products demanded by the market. This has generated that currently the glycerol is already more considered as a waste than as an industrial raw material.

Furthermore, its presence in the biofuel, even in very small amounts, is harmful to combustion engines; so that the conventional production process of biodiesel includes an additional step of cleaning it from the biofuel produced, conducted to the total removal of the glycerol, lower levels up to 0.02%, according to what is indicated by the international quality standards. Thus, this alternative proposal, as less implies a significant reduction in process costs and improving performance. The Ecodiesel is obtained by enzymatic transesterification of triglycerides and short chain alcohols (ethanol) with 1, 3 selective lipases: either with porcine pancreatic lipase (PPL), initially applied in the original patent, or with various microbial lipases, which has recently been used to further optimize this studied process.

In this thesis are collected all the performed works to further optimize this enzymatic process, thus implementing their economic viability to the application of new lipase biocatalysts in the production of Ecodiesel. In this sense, the greatest novelty and progress predicted through this research work is to overcome the usual associated inconvenient with the enzymatic production of biodiesel. It is derived from

SUMMARY

the high cost of the very much purified enzymes until now employed, since they are difficult to obtain from microorganisms, which were subjected to genetic and biotechnological techniques. This research work presents a wide study, evaluation and selection of different lipases and various enzyme systems obtained from them, in free or immobilized form, quite purified commercial or slightly purified extracts from wild strains, which were isolated from lipophilic environments (vegetable oil and animal /fats). Also, it is studied standard extracts from strains of the same species of commercial lipases. In this sense, one of the most common and productive lipase in this process, such as *Candida antarctica* type B (CALB) was chosen. This standard strain was obtained from the CECT (Type Microbial Cultures Spanish Collection) and was also tested. All these research works were developed in order to select the most effective lipases or enzymatic systems to optimize the production of this proposed biofuel. As well as its biotechnological development, for future application to commercial scale, to enable and make viable the technological development of a sustainable system of biofuel production.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Como objetivo general, se pretende optimizar la producción del biocombustible Ecodiésel aplicando un proceso de etanolisis selectiva por vía enzimática, tanto evaluando diferentes sistemas lipásicos, como determinando los parámetros más influyentes (y sus valores óptimos) en el rendimiento de las reacciones de transesterificación evaluadas. Este proceso biotecnológico se presenta como alternativa a los procesos químicos convencionales, ya que pretende ser más respetuoso con el medio ambiente y a la vez más rentable desde el punto de vista económico que los procesos enzimáticos hasta ahora investigados.

En este sentido, en este trabajo de investigación se abordan varias líneas para conseguir este objetivo:

- Evaluación y estudio de una lipasa de bajo costo, habitualmente usada en la industria alimentaria, como emulgente en la panificación. Se trata de la "Lipopan 50 BG" de *Novozymes* (obtenida a partir de una cepa genéticamente modificada de *Aspergillus niger*, siendo la fuente inicial *Thermomices lanuginosus*). La elección de este preparado enzimático viene motivado por ser económicamente asequible y encontrarse disponible en el mercado, para poder fácilmente aplicarlas en nuestro ámbito, la producción enzimática de biodiésel.
- Estudio y optimización de las condiciones y parámetros de reacción de una de las lipasas comerciales más habitualmente aplicada en la producción enzimática de biodiésel, la CALB (*Candida antarctica* tipo B) en diferentes sistemas o modalidades:
 - a. "N435" (*Candida antarctica* tipo B o CALB recombinante, expresada en *Aspergillus niger*, inmovilizado en resina acrílica macroporosa) de *Novozymes*, que nos servirá como punto de partida y como referente a tener en cuenta respecto a las condiciones estándar para los subsecuentes estudios con variadas y diferentes lipasas.

OBJETIVOS

- b. Evaluación de la lipasa CALB comercial inmovilizada por adsorción física en soportes inorgánicos; concretamente en materiales Mesoporosos Organosilíceos Ordenados (PMO) y material síliceo amorfo MS-3030 funcionalizado con grupos octilo anclados.
- c. Evaluación de extractos procedentes de una cepa estándar, de la misma especie, la *Candida antarctica* tipo B (CALB) adquiridas en la CECT (Colección Española de Cultivos Tipo). Estos extractos son obtenidos a partir de cultivos líquidos, mediante liofilización con diálisis previa, se trataría de un método de purificación más simple (y económico) que los sistemas comerciales, muy purificados.
 - Búsqueda, evaluación y selección de cepas microbianas silvestres en ambientes lipófilos (ricos en aceite vegetal y grasa animal), que presumiblemente poseerían lipasas 1,3-selectivas muy eficaces, capaces de realizar reacciones de transesterificación selectivas, útiles en la síntesis del Ecodiésel, biocombustible de segunda generación.

Independientemente, del sistema enzimático investigado, van implícitos los siguientes objetivos:

- Obtención de un biocombustible exento de glicerina y con una viscosidad adecuada para su uso en motores diésel, puro o en mezclas con diésel de origen fósil.
- Optimización de los parámetros de la reacción de alcoholisis con etanol para la obtención de un biocombustible con las características antes enunciadas.
- Aplicación de un método analítico rápido y fiable, basado en la cromatografía de gases, para la caracterización de los productos obtenidos en la reacción de la alcoholisis parcial de triglicéridos, consistente en mezclas de FAEEs, MGs y DGs, en proporciones variables

PLAN DE TRABAJO

El plan de trabajo previsto para la realización de la presente tesis doctoral se describe a través de los siguientes apartados:

1. **Estudio, evaluación y optimización de las condiciones y parámetros de reacción de transesterificación del preparado enzimático comercial de Novozymes "Lipopan 50 BG"** (lipasa obtenida a partir de una cepa genética modificada de *Aspergillus niger*, siendo la fuente inicial *Thermomices lanuginosus*).

Se realizará un estudio de optimización univariable (OVAT) con esta lipasa comercial, que habitualmente se utiliza como emulsionante en la industria panificadora. Se trata de un preparado enzimático de bajo costo que nunca se ha aplicado como biocatalizador en ningún proceso químico, así se ha elegido como tal en este proceso, con el fin de mejorar la viabilidad económica del proceso de producción de biocombustibles. Los resultados obtenidos, en cuanto a los parámetros más influyentes en el rendimiento y sus valores óptimos, servirán como referencia para comparar resultados, con otras lipasas e incluso para desarrollar propuestas de inmovilización.

2. **Estudio, evaluación y optimización de las condiciones y parámetros de reacción de la lipasa CALB (Lipasa tipo B de *Candida antarctica*) obtenida en diferentes sistemas o modalidades de purificación:**

2.1."N435" (*Candida antarctica* tipo B o CALB recombinante, expresada en *Aspergillus niger*, inmovilizado en resina acrílica macroporosa).

Se trata de un sistema catalítico comercial, a base de CALB, que aunque no es novedad su aplicación como biocatalizador para la producción de biodiésel enzimático convencional, en este trabajo de tesis doctoral es evaluado en una nueva aplicación, como es comprobar su viabilidad en la producción de Ecodiésel, mediante un proceso 1,3 selectivo. También servirá como elemento de referencia

para otros estudios efectuados con diferentes sistemas catalíticos basados en lipasas CALB. Para efectuar el proceso de optimización multivariable es empleada la Metodología de Superficie de Respuesta (RSM) para estimar los principales parámetros que afectan al rendimiento de la reacción de transesterificación 1,3-selectiva. Se determinarán las condiciones óptimas para lograr valores apropiados de viscosidad y conseguir elevada selectividad y conversión aplicando un diseño multifactorial de experimentos con tres factores (temperatura de reacción, relación aceite/etanol y alcalinidad del medio de reacción) usando el software *Stat Graphics® "Centurion XV.I."*

También se comprobará la evolución del rendimiento de la reacción a lo largo del tiempo de reacción y la vigorosidad del sistema biocatalítico, al efectuarse varios ciclos de reacción sucesivos.

2.2 Lipasa CALB inmovilizada en otros soportes inorgánicos

Evaluación de la lipasa CALB comercial inmovilizada en otros soportes inorgánicos, concretamente materiales Mesoporosos Organosilíceos Ordenados (PMO) y material silíceo amorfo MS-3030 funcionalizado con grupos octilo anclados, como sistema biocatalítico en la reacción de etanolisis del aceite de girasol para producir Ecodiésel (FAEE + MG). También se comprobará la evolución del rendimiento de esta reacción a lo largo del tiempo de reacción y la vigorosidad del sistema biocatalítico, al efectuarse varios ciclos de reacción sucesivos.

2.3. Cepa estándar de *Candida Antarctica* procedente de la CECT (Colección Española de Cultivos Tipo).

En este apartado se realizarán diversos estudios encaminados a dilucidar las condiciones óptimas de crecimiento y la capacidad transesterificadora de una cepa estándar adquirida en la C.E.C.T. (Colección Española de Cultivos Tipo).

Se evaluará el comportamiento catalítico de extractos enzimáticos obtenidos a partir de cultivos líquidos de una cepa estándar de CALB, para compararlos con las enzimas comerciales procedentes de la misma especie de microorganismo. Así, realizamos un estudio para determinar las condiciones óptimas de cultivo del microorganismo (medio de cultivo, temperatura, tiempo de cultivo, etc). A través de un proceso de liofilización y diálisis previa de los cultivos líquidos, son obtenidos los extractos enzimáticos, que son aplicados como biocatalizadores en las correspondientes reacciones de transesterificación 1,3-selectivas, comprobándose así su viabilidad y estabilidad. También se evaluará la evolución del rendimiento de la reacción a lo largo del tiempo de reacción y la vigorosidad del sistema biocatalítico, al efectuarse varios ciclos de reacción sucesivos.

3. Búsqueda, evaluación y selección de cepas microbianas silvestres en ambientes lipófilos (ricos en aceites vegetales o en grasas animales), con lipasas 1,3-selectivas eficaces, capaces de realizar reacciones de transesterificación útiles en la síntesis de biocombustibles de segunda generación.

Tras realizar la correspondiente recogida de muestra de un número elevado de cepas, tanto en ambientes lipófilos de origen vegetal ("almazara de aceite de oliva") y de origen animal ("serrín de pescado y grasa de jamón"), se aplicarán técnicas de "screening" para comprobar cuáles presentan actividad biocatalítica de transesterificación, de las que se seleccionarán las más eficaces. A partir de sus

cultivos líquidos se obtendrán los correspondientes extractos enzimáticos, mediante un proceso que consta de una diálisis previa y liofilización. Estos extractos serán evaluados en la reacción de transesterificación 1,3-selectiva con etanol, comprobándose la evolución del rendimiento de reacción en el tiempo, y también su estabilidad, a través de la repetición de varios ciclos de reacciones. Se procederá a la caracterización de las cepas más eficaces, mediante un análisis filogenético basado en la técnica del ARNr 16S determinando el Género y especie de las mismas. También se estudiarán los medios y condiciones de cultivo óptimos para producir los extractos con actividades lipásicas más eficaces.



Ramón Lapayese del Río (1956)

1. INTRODUCCIÓN

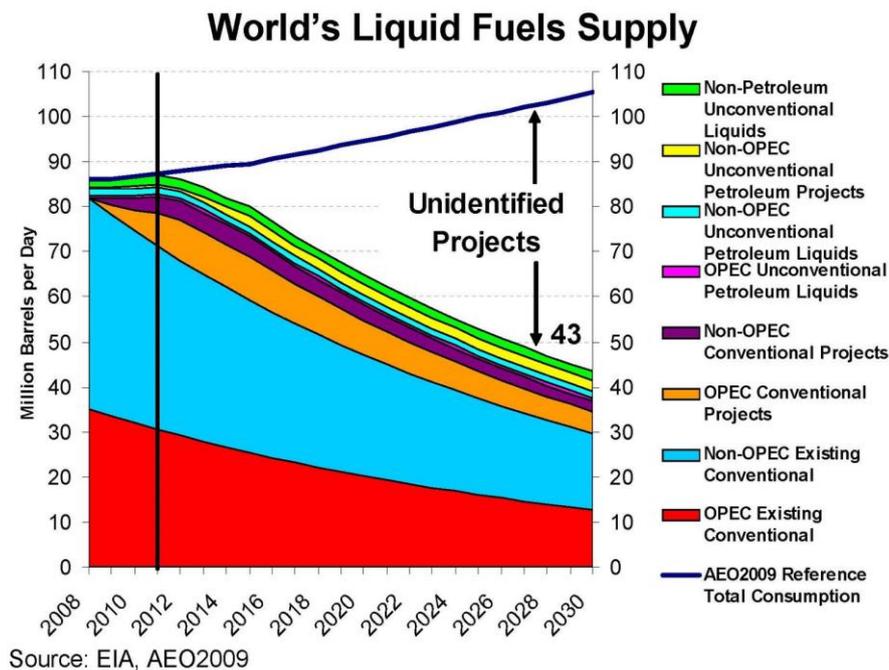
1.1. SITUACIÓN ACTUAL DE LOS BIOCOMBUSTIBLES

En la actualidad, existe el consenso, según el cual las tendencias observadas en el calentamiento global de la Tierra son ocasionadas principalmente por el elevado empleo de combustibles fósiles y en general, por las emisiones antropogénicas de gases de efecto invernadero (GEI). Para evaluar este impacto se estableció inicialmente (1992) la Convención Marco de Naciones Unidas sobre el Cambio Climático, que concluyó en el desarrollo del Protocolo de Kioto de 1997, como una manera de abordar de forma práctica este problema. En 2002 la Unión Europea ratificó el Protocolo de Kioto y puso de relieve el potencial para la innovación científica como medio de contrarrestar las emisiones de GEI. Ninguna de estas metas, ni los objetivos de Kioto, hasta la fecha se han cumplido. Así, se ha comprobado como los transportes de todo tipo, a los que no parece tan fácil renunciar, son los responsables de las elevadas tasas de crecimiento en las emisiones de gases de efecto invernadero, respecto a cualquier otro sector (20% las emisiones mundiales de CO₂ en los últimos diez años), con un previsible incremento del uso de la energía y las emisiones de carbono del orden del 80%, de hoy al 2030.

El petróleo a nivel mundial es actualmente, de forma indiscutible, la principal fuente primaria de energía y productos químicos, con una demanda de cerca de 12 millones de toneladas por día (84 millones de barriles), con una proyección de aumento a 16 millones de toneladas por día (116 millones de barriles) para 2030, según las previsiones de la Agencia Internacional de la Energía, mostradas en la **Figura 1.1**. A pesar de que en la actualidad un 30% del consumo mundial de petróleo se dedica al transporte, se prevé que el 60% del aumento de la demanda prevista para 2030 corresponde al transporte. Este sector del transporte, en expansión en los EE.UU. y Europa, y especialmente en las economías emergentes de China y la India, puede

1. INTRODUCCIÓN

fácilmente incluso sobrepasar estas previsiones. Por ello, se está haciendo un esfuerzo sin precedentes para evaluar las diferentes alternativas (energía fotovoltaica, la eólica, el hidrógeno y la energía nuclear) que permitan realizar de forma paulatina la sustitución del gas natural, el carbón y el petróleo en el sector de la generación de electricidad. Sin embargo, no existe tal equivalente en el transporte aéreo, ya que los aviones capaces de usar pilas de combustible o motores eléctricos requieren todavía un largo camino para poder competir con los motores de explosión o combustión, desarrollados al final del siglo XIX para su uso con etanol y aceites vegetales, y muy perfeccionados a lo largo del siguiente siglo, para su adaptación a las fracciones petrolíferas, denominadas gasolina, keroseno y diésel, respectivamente.



8

Figura. 1.1. Consumo de petróleo en los últimos 20 años, previsto por la Agencia Internacional de Energía (AIE). (Calero et al., 2015)

1. INTRODUCCIÓN

Tenemos por tanto que, a corto y medio plazo, parece imprescindible obtener una alternativa técnica, económica y medioambientalmente viable para sustituir los actuales combustibles fósiles. En este sentido, el biodiésel y el bioetanol, combustibles de origen agrícola, surgen como una alternativa real al uso de la gasolina y el gasóleo convencional en el transporte, dado el aumento exponencial en el consumo de biocarburantes al que estamos asistiendo en los últimos años. En este sentido, la Agencia Internacional de Energía (AIE) ha pronosticado en el escenario de referencia, que la necesidad de energía primaria en el mundo para crecer en un 55% entre 2005 y 2030, de tal forma que para 2025, la demanda mundial de petróleo se dispara hasta el 60%, mientras que la capacidad de producción podría experimentar una recaída a los niveles de 1985.

En este sentido, el uso actual de los combustibles fósiles es considerado como insostenible, ya que es de prever que los recursos fósiles se irán agotando paulatinamente. Además, la acumulación de gases de efecto invernadero en el medio ambiente ya ha superado el umbral "peligrosamente alto" de 450 ppm de CO₂ (A. Singh, Nigam, & Murphy, 2011). En consecuencia, con el aumento de las emisiones antropogénicas de GEI y las reservas fósiles cada vez más limitadas, debido principalmente a la utilización a gran escala de combustibles fósiles para el transporte, la electricidad y la generación de energía térmica, es urgente desarrollar técnicas de reducción y adoptar políticas para promover las fuentes de energías renovables que sean capaces de reducir al mínimo la dependencia de las reservas fósiles y también para mantener la sostenibilidad ambiental y económica (D. Chen & Liu, 2011) . Pero esto es especialmente necesario en el caso de los combustibles que se emplean en los aviones (Q. Li et al., 2011). Por lo tanto, a corto y medio plazo, parece esencial desarrollar alternativas técnicas, económica y ambientalmente viables, para sustituir a

1. INTRODUCCIÓN

los combustibles fósiles actuales, que permitan su uso en los actuales motores diésel sin realizar en los mismos ninguna modificación (Dhar, Kevin, & Agarwal, 2012).

La mayoría de los países de la UE, incluido España, ya han comenzado a desarrollar tecnologías y cultivos energéticos para la introducción gradual de estos combustibles, como en el caso de Brasil, que produce bioetanol a partir de caña de azúcar, y Estado Unidos, a partir de maíz. En la **Tabla 1.1** se observa la evolución del consumo de biodiésel en Europa, así como una previsión de su consumo basada en las directrices europeas aprobadas para el fomento de uso de biocarburantes. De hecho, el mercado mundial de los biocombustibles está creciendo continuamente, debido sobre todo a las fuertes subvenciones que recibe, en base a su inocuidad medioambiental, ya que no computa a efectos del CO₂ que generan en su combustión (Tratado de Kyoto), disminuyendo la emisiones de SO_x (óxidos de azufre) y reduciéndose notablemente el nivel de partículas en comparación con los combustibles de origen fósil, cuando se encuentran mezclados con ellos en diferentes proporciones, según se indica en la **Figura 1.2**.

A este respecto, aunque el motor diésel, inventado por Rudolph Diesel hace más de un siglo, estaba diseñado para funcionar con aceite de cacahuete, los motores de combustión actuales están rediseñados para funcionar con hidrocarburos obtenidos del petróleo. Por lo tanto, un sustituto para los combustibles de los actuales motores diésel, obtenidos a partir de fuentes renovables habrá de tener propiedades idénticas o muy similares a los hidrocarburos empleados como combustibles.

1. INTRODUCCIÓN

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

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

La razón principal que impide el empleo de un aceite vegetal puro como combustible en los motores diésel actuales es su alta viscosidad, de 10 a 20 veces mayor, dependiendo de su origen, que el combustible diésel convencional (por lo general en el rango de 28-40 mm²/s, dependiendo del perfil lipídico del aceite). Por esto, los motores convencionales de encendido por compresión, diseñados para funcionar con combustibles diésel de petróleo, pueden experimentar diversos problemas cuando se les hace funcionar con aceites vegetales puros. Aquí se pueden incluir, entre otros, la coquización y obstrucción de los inyectores por depósitos de carbono, y la gelificación del aceite lubricante por interacción con los aceites vegetales (Yusuf, Kamarudin, & Yaakub, 2011).

1. INTRODUCCIÓN

En este sentido, la tecnología más conocida de las actualmente existentes para procesar los aceites vegetales o grasas animales, se basa en su conversión de los triglicéridos a ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME), mediante una reacción de transesterificación con metanol. Sin embargo, hay descritos otros procedimientos para transformar los aceites vegetales o grasas animales en biocombustibles, incluyendo el uso directo del aceite vegetal, en microemulsiones o emulsificaciones, en mezclas con el diésel fósil.

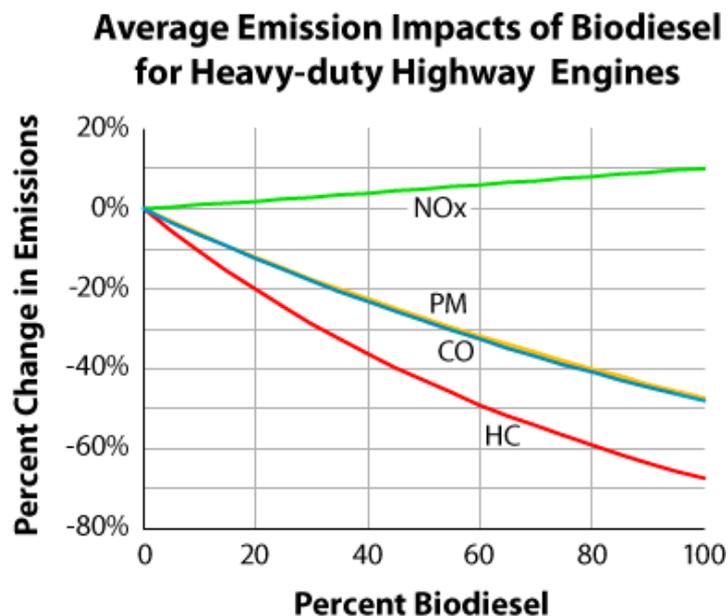


Figura 1.2. Reducción de las emisiones del biodiésel con respecto al diésel convencional (Fuente: U.S. Environmental Protection Agency, EPA. A Comprehensive Analysis of Biodiesel Impacts on Exhaust Emissions).

1. INTRODUCCIÓN

Además, se han desarrollado diversos procedimientos para la producción de biocombustibles que genéricamente se denominan "diésel renovable", debido a que su composición se asemeja a la de los combustibles fósiles derivados del petróleo, por lo que pueden emplearse puros, sustituyendo al diésel convencional. Así, varios procesos (cracking o pirólisis, hidrodeshidrogenación y hidrotratamiento) se han descrito para obtener estos biocombustibles que se asemejan al diésel de petróleo (Borges & Diaz, 2012; Helwani, Othman, Aziz, Fernando, & Kim, 2009; Smith, Greenwell, & Whiting, 2009; Yusuf et al., 2011). En la **Figura 1.3** (Calero et al., 2015), se muestran los principales métodos existentes actualmente para la transformación de triglicéridos en biocombustibles aplicables a motores diésel. De entre ellos, la transesterificación de los aceites vegetales es en la actualidad el método más común para la producción del biocombustibles denominado biodiésel. Este procedimiento relativamente sencillo es capaz de reducir la viscosidad del aceite a un nivel ($4-5 \text{ mm}^2 / \text{s}$) similar al del diésel convencional obtenido del petróleo, Debido a su simplicidad, ha sido ampliamente estudiado e industrialmente es el único método actualmente utilizado para convertir el aceite vegetal en biodiésel (Juan, Kartika, Wu, & Hin, 2011).

Así, dado que se espera que la cuota de biocarburantes en el mercado de los combustibles de automoción crezca rápidamente en la próxima década, se considera que el biodiésel convencional tendrá un papel preponderante entre los biocombustibles, de los que también se espera contribuyan al aprovisionamiento energético de la mayoría de países, independientemente de su nivel de desarrollo (A. Demirbas, 2009). Así, la producción de biodiésel en los últimos años se considera que presenta cierto potencial como alternativa para cubrir parcialmente las previsibles demandas energéticas futuras en el sector del transporte (Luque et al., 2008; Oh, Lau, Chen, Chong, & Choo, 2012).

1. INTRODUCCIÓN

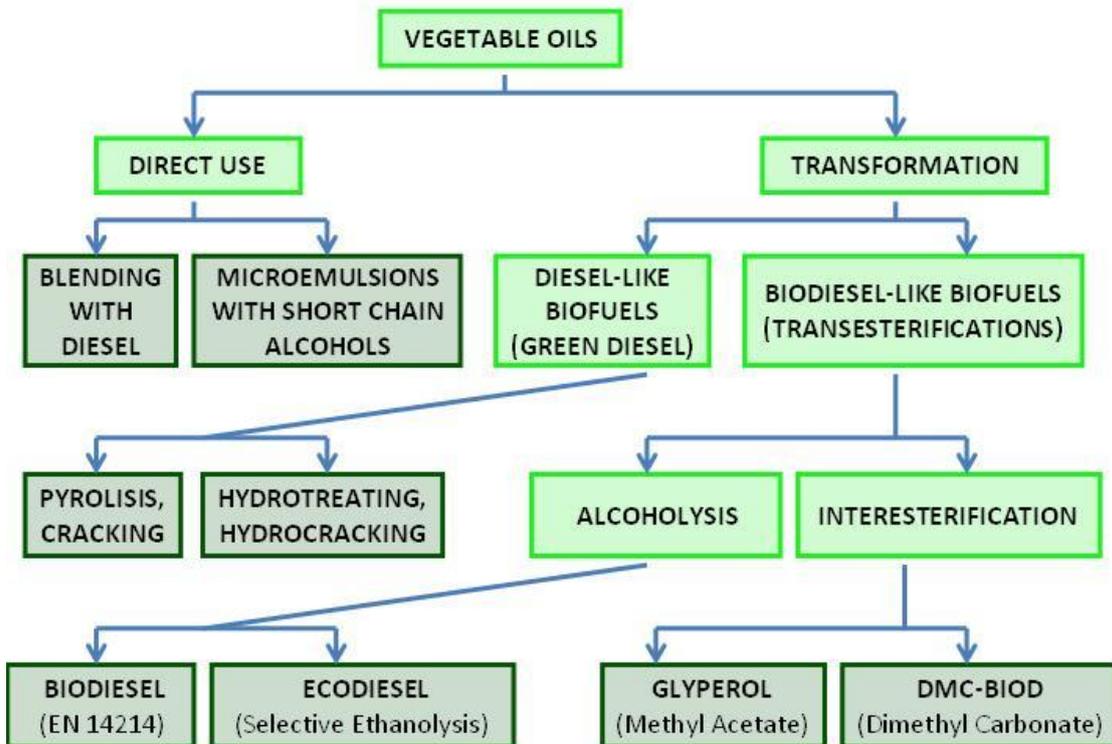


Figura 1.3. Diferentes métodos para la conversión de aceites vegetales en biocombustibles (Calero et al., 2015).

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

En este propósito, en la mayoría de los países de nuestro entorno se están adoptando diferentes medidas para el “fomento del uso de biocarburantes y otros combustibles renovables con fines de transporte”, como las contempladas en la *ORDEN* publicada en el BOE (16487/ITC/2877/2008, de 9 de octubre por el Ministerio

1. INTRODUCCIÓN

de Industria Turismo y Comercio. En el preámbulo de la misma se resalta que *“la importancia del incremento del uso de los biocarburantes en el transporte radica, no sólo en la reducción de las emisiones de gases de efecto invernadero imputable a la sustitución de carburantes fósiles por biocarburantes, sino también en su carácter renovable, su contribución a la diversificación del consumo de energía primaria y a una menor dependencia energética de dichos carburantes fósiles, y en los efectos arrastre positivos que podrían derivarse sobre las explotaciones agrarias y el medio rural”*.

Así mismo, es también digno de mencionar que se defina el término “biomasa” como: la fracción biodegradable de los productos, desechos y residuos procedentes de la agricultura (incluidas las sustancias de origen vegetal y de origen animal), de la silvicultura y de las industrias conexas, así como la fracción biodegradable de los residuos industriales y municipales. Así mismo, se definen los combustibles líquidos o gaseosos para transporte producidos a partir de la biomasa, y que podrán considerarse como «biocarburantes y otros combustibles renovables», los productos enumerados a continuación:

- a) «Bioetanol»: alcohol etílico producido a partir de productos agrícolas o de origen vegetal, ya se utilice como tal o previa modificación o transformación química;
- b) «Biodiésel»: éster metílico o etílico producido a partir de grasas de origen vegetal o animal;
- c) «Biogás»: combustible gaseoso producido por digestión anaerobia de biomasa;
- d) «Biometanol»: alcohol metílico obtenido a partir de productos de origen agrícola o vegetal, ya se utilice como tal o previa modificación o transformación química;
- e) «Biodimetiléter»: DME (dimetiléter) producido a partir de la biomasa;

1. INTRODUCCIÓN

- f) «BioETBE»: ETBE (etil ter-butyl éter) producido a partir del bioetanol;
- g) «BioMTBE»: MTBE (metil ter-butyl éter) producido a partir del biometanol;
- h) «Biocarburantes sintéticos»: hidrocarburos sintéticos o sus mezclas, producidos a partir de la biomasa;
- i) «Biohidrógeno»: hidrógeno producido a partir de la biomasa u otras fuentes renovables de energía;
- j) «Aceite vegetal puro»: aceite obtenido a partir de plantas oleaginosas, crudo o refinado, pero sin modificación química;
- k) «Otros biocarburantes»: otros combustibles para transporte producidos a partir de biomasa, tales como otros bioalcoholes, bioésteres y bioéteres distintos de los enumerados; los productos producidos por tratamiento en refinería de biomasa, como el hidrobiodiésel, la biogasolina y el bioLPG; y los carburantes de biorefinería.

Este listado supone una clara definición de los productos que pueden emplearse sin mayor aclaración, para ser mezclados con la gasolina o el diésel de origen fósil, en las proporciones que en cada momento marque la ley como aditivo, e incluso en el caso de incorporarse en mayor proporción bastaría indicar los términos *biodiésel* o *biogasolina*, en función de su aplicación en motores diésel o gasolina.

Los biocombustibles suelen considerarse de *primera* o segunda generación en función de la materia prima empleada (**Figura 1.4**). Así, si se emplean productos agrícolas comestibles (maíz o caña de azúcar) para producir bioetanol, o aceites comestibles (soja, girasol, colza, o grasas animales comestibles) para producir biodiésel, se trata de biocombustibles de *primera generación*. La sensibilización social respecto al problema que puede originarse en un futuro, al detraer alimentos para su uso energético, ha propiciado la investigación en tecnologías que posibiliten la

1. INTRODUCCIÓN

utilización de residuos agrícolas o industriales para su transformación en biocombustibles, pasando estas tecnologías a denominarse de *segunda generación*.

En lo que respecta al biodiésel, se considera de segunda generación el producido a partir de aceites obtenidos mediante cultivos de plantas no comestibles (o de algas, de gran actualidad), aceites usados o de mala calidad, aceites no aptos para consumo humano o desechos ricos en grasas de algunas industrias como mataderos, además de restos de cualquier tipo de triglicéridos no comestibles. Es evidente que debe tenerse un especial cuidado para seleccionar la tierra y los cultivos destinados a la producción de materia prima, no reemplazar zonas destinadas para el cultivo de productos de consumo humano, o utilizar cultivos no aptos para el consumo humano (Luque et al., 2008).

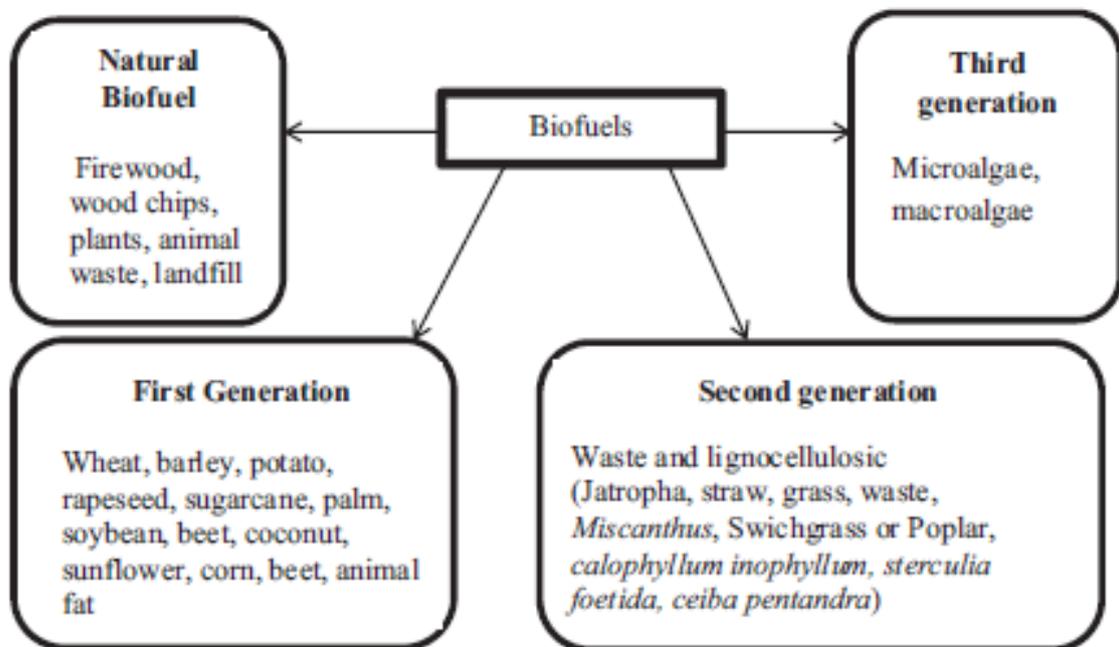


Figura 1.4. Clasificación de Biocombustibles.

1. INTRODUCCIÓN

1.2. BIODIÉSEL: CONCEPTO, PERSPECTIVAS Y TECNOLOGÍAS PARA SU PRODUCCIÓN

El biodiésel convencional es por tanto uno más de los biocombustibles de origen renovable, capaz de operar en motores diésel, constituido por una mezcla de FAMEs ("*Fatty Acid Methyl Ester*") obtenido mediante una reacción de transesterificación de aceites vegetales u otras materias primas, como pueden ser grasa animal o aceite usado, con alcoholes simples como metanol o etanol para dar los correspondientes monoalquil ésteres, obtenidos en un proceso consecutivo de alcoholisis (Calero et al., 2015). El esquema de reacción de la **Figura 1.5**, representa los pasos sucesivos de la reacción de transesterificación con metanol (metanolisis).

En efecto, la reacción de transesterificación de un mol de triglicérido (TG) con tres moles de alcohol forma un mol de glicerina (GLY) y tres moles de ésteres del ácido graso, constituyendo en realidad una secuencia de tres reacciones reversibles, en las cuales la molécula de triglicérido se convierte paso a paso en diglicérido (DG), monoglicérido (MG) y glicerina. En cada etapa se consume un mol de alcohol y se libera un mol de éster. Normalmente, para poder desplazar el equilibrio, el alcohol se emplea en exceso, respecto a la cantidad estequiométrica, en el proceso de producción de biodiésel por el método convencional.

Tras la reacción, se obtienen dos fases no miscibles (**Figura 1.6**), una fase superior donde se encuentran los ésteres etílicos (o metílicos), es decir el biodiésel, y una fase inferior donde está la glicerina disuelta en el exceso del alcohol empleado. También se encuentra disuelta una pequeña cantidad de FAME, que no sólo reduce el rendimiento, sino que ensucia la glicerina obtenida.

1. INTRODUCCIÓN

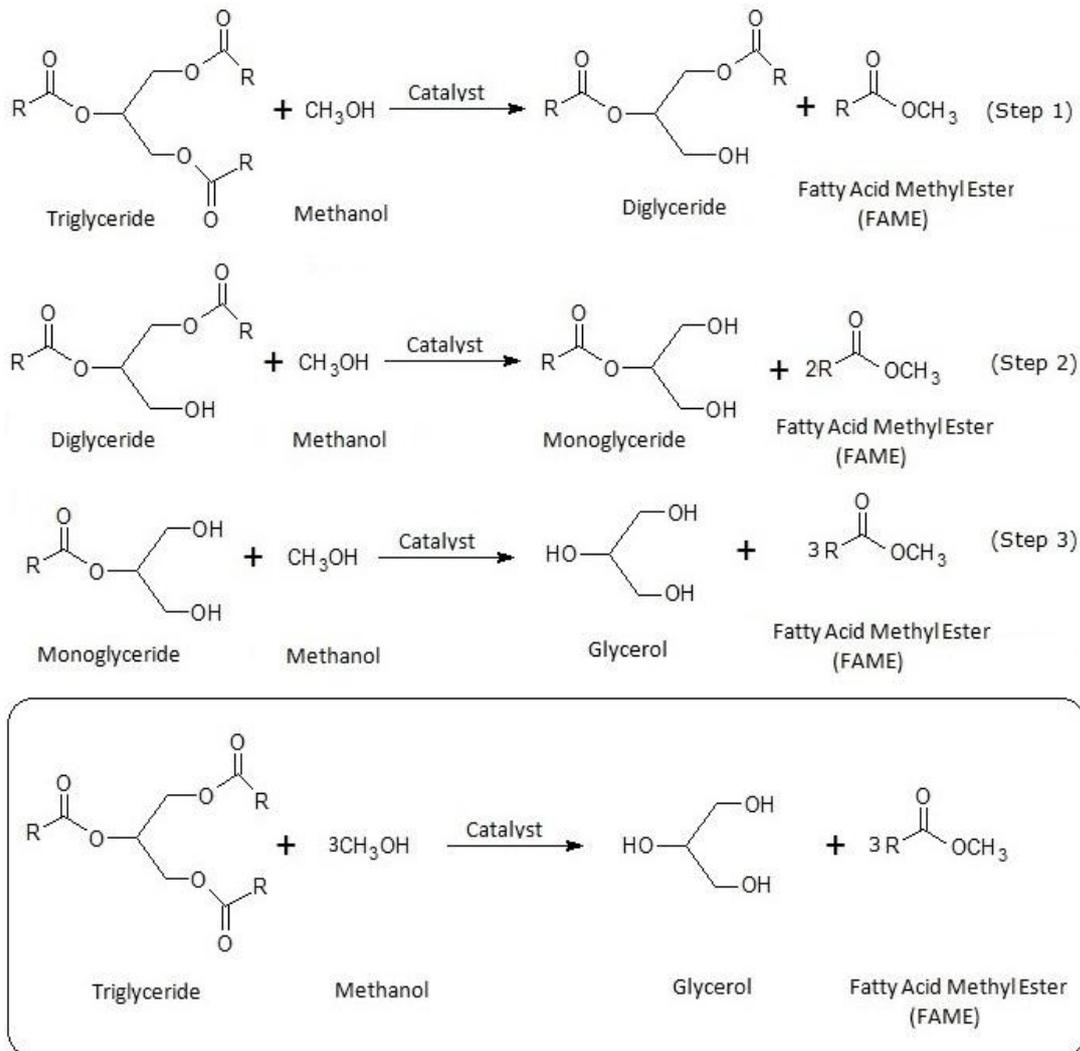


Figura 1.5. Esquema de la reacción de transesterificación de triglicéridos con metanol (metanolisis) mediante catálisis básica.

Como combustible, el biodiésel tiene un valor calórico comparable al diésel convencional de origen fósil, posee también mayor eficiencia de combustión, mayor punto de inflamación, un índice de cetano superior y posee una mejor eficiencia lubricante. En lo que se refiere a la seguridad, el punto de inflamación superior hace

1. INTRODUCCIÓN

que el biodiésel sea más seguro para su manejo, transporte y almacenamiento. Los beneficios de los biocombustibles frente a los combustibles no renovables también incluyen una mayor seguridad energética, la reducción del impacto ambiental, ahorro de divisas, y ventajas socioeconómicas relacionadas con el sector rural.

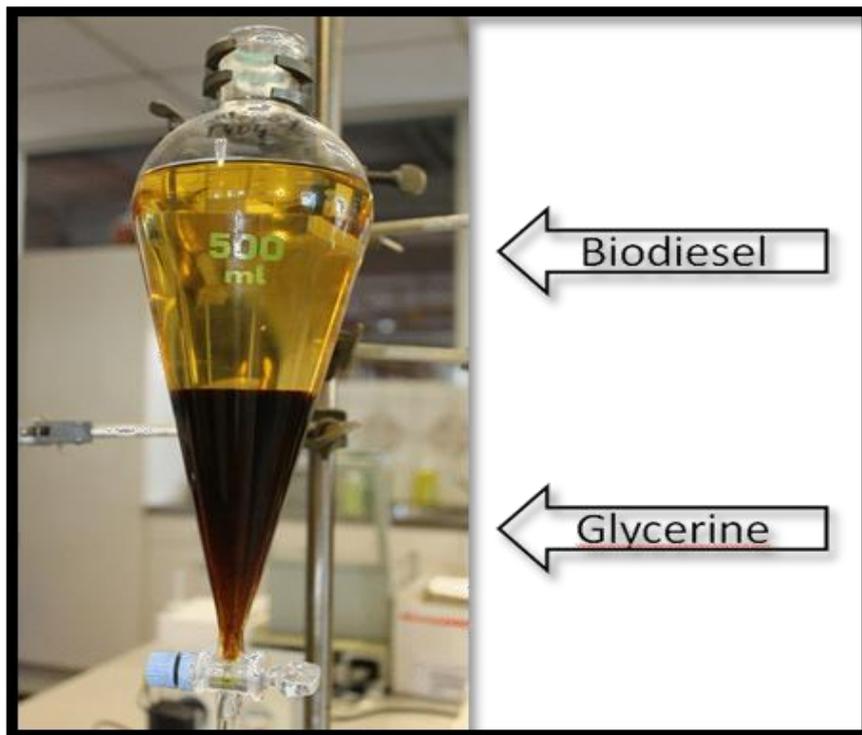


Figura 1.6. Separación por decantación del biodiésel y el glicerol disuelto en el exceso de alcohol.

El biodiésel presenta también importantes ventajas en comparación con el diésel de origen fósil, en lo que respecta a la calidad de los productos de combustión, con menores emisiones de gases contaminantes (excepto NO_x), según se recoge en la **Figura 1.2**, biodegradabilidad, ausencia de azufre, mayor poder lubricante

1. INTRODUCCIÓN

del motor, un balance energético positivo, elevado punto de inflamación (*flash point*), compatibilidad con las infraestructuras logísticas existentes, es renovable y se puede fabricar incluso con residuos de materias primas de origen doméstico. Sólo presenta un serio inconveniente, la producción de glicerol como subproducto de la reacción de transesterificación y todo lo que ello conlleva, como la necesidad de lavar el biodiésel, ya que una parte mínima de la glicerina se disuelve en el FAME, y la purificación de la glicerina obtenida, que también arrastra una pequeña cantidad de FAME. En este sentido, el uso comercial de este combustible requiere un exhaustivo análisis del FAME obtenido y purificado, para garantizar su pureza, utilizando sofisticados equipos para asegurarse de que se ajusta a las normas internacionales ASTM D 6751 y EN 14214. Sin embargo, hay varios retos técnicos que aún deben superarse, para hacer viable económicamente el uso de biodiésel.

La posibilidad del empleo de aceites y grasas residuales en la producción de biodiésel contribuye a la conservación del medio ambiente. Al mismo tiempo, la principal desventaja relativa a la producción de biodiésel a partir de aceites vegetales comestibles, como canola, palma, girasol o aceite de coco, es el aún alto precio de los aceites vegetales comestibles, en comparación con la del combustible diésel de origen fósil. Es por este motivo que, en la actualidad se investiga el uso de aceites no comestibles, tales como ricino, *jatropha*, o aceites de cocina usados, para la producción de biodiésel. Así, para el biodiésel de segunda generación se propone obtener la materia prima a partir de algas y otras materias primas renovables no comestibles que proporcionen la sostenibilidad de todo el proceso de producción del biodiésel, sin afectar los usos alimentarios de otras materias primas.

En general, se prefiere el metanol como agente de transesterificación, debido a sus ventajas económicas y a que la reacción de metanolisis se puede catalizar por ácidos (Guan, Kusakabe, Sakurai, & Moriyama, 2009; Soriano, Venditti, &

1. INTRODUCCIÓN

Argyropoulos, 2009), bases (Veljkovic, Stamenkovic, & Tasic, 2014) y enzimas (A. Macario, Verri, Diaz, Corma, & Giordano, 2013). El uso de enzimas conduce a selectividades satisfactorias, pero la aplicabilidad de este método está limitada económicamente por el alto precio de las enzimas, los grandes volúmenes de reacción y las velocidades de reacción. Al comparar la economía del biodiésel convencional producido enzimáticamente y químicamente, hay factores importantes a considerar, tales como el rendimiento, la flexibilidad en la materia prima, el valor de los subproductos, los costos de recuperación del alcohol y de la glicerina obtenida, así como el costo y las posibilidades de reutilización de la enzima.

En este sentido, las ventajas e inconvenientes del uso de lipasas como biocatalizadores respecto a los métodos químicos, mediante catálisis alcalina o ácida, están relacionados principalmente con los tiempos de reacción más cortos y mayores rendimientos obtenidos, cuando se aplica transesterificación química. Sin embargo, estos procesos alcalinos o los catalizados por ácidos presentan mayores costes energéticos, mayores dificultades en la recuperación del catalizador y del glicerol, con un mayor potencial de contaminación ambiental (Guldhe, Singh, Mutanda, Perrnau, & Bux, 2015; Marchetti, Miguel, & Errazu, 2007).

En general, las lipasas realizan su actividad catalítica en condiciones más suaves, pudiendo operar con materias primas con altos niveles de FFA como sucede con los aceites usados residuales. Además, la separación y purificación de biodiésel es mucho más fácil, lo que resulta en un proceso más respetuoso del medio ambiente. Sin embargo, uno de los "cuellos de botella" para la aplicación industrial de las lipasas es el alto costo de los biocatalizadores. En este sentido, se están investigando diversos métodos de inmovilización para mejorar la estabilidad de la lipasa a fin de permitir su reutilización (Anastasia Macario & Giordano, 2013).

1. INTRODUCCIÓN

Sin embargo, el rendimiento de los catalizadores básicos homogéneos en el proceso de transesterificación depende en gran medida del contenido en ácidos grasos libres (FFA) y del contenido en agua. Un contenido superior al 0,5% en peso de FFA o 0.6% en peso de agua reduce la actividad del catalizador básico homogéneo debido a la formación de jabones. El uso de catalizadores ácidos homogéneos como H_2SO_4 o HNO_3 , no presenta problema alguno ya que su funcionamiento no se ve marcadamente afectado por la presencia de ácidos grasos libres o de agua, ya que pueden catalizar simultáneamente tanto la esterificación de los ácidos libres como la transesterificación de los triglicéridos.

No obstante, las reacciones catalizadas en medio ácido no se aplican tan habitualmente como las reacciones llevadas a cabo en medio básico, debido a que la reacción implica tiempos más largos de reacción (hasta 96 h) y mayores cantidades de alcohol, ya que se requieren relaciones molares de alcohol respecto al aceite (hasta 150:1 mol). El catalizador más utilizado es H_2SO_4 (ácido sulfúrico) y la concentración varía entre 1 y 5% en peso. Las altas concentraciones de H_2SO_4 pueden promover una mayor conversión, sin embargo un exceso también puede promover la formación de éteres por deshidratación de alcoholes. Además, la cantidad de CaO requerida para neutralizar el H_2SO_4 se incrementa al aumentar la concentración de este ácido en la reacción. Mediante el uso de una temperatura de funcionamiento alta se puede lograr una alta conversión en menos tiempo. Además, los catalizadores ácidos son más corrosivos que los básicos limitando sus aplicaciones industriales (Luque & Clark, 2011).

Una de las principales desventajas con el uso de catalizadores homogéneos es la necesidad de una importante etapa de neutralización y purificación de la reacción, que produce grandes cantidades de aguas residuales, un proceso poco benigno desde el punto de vista medioambiental.

1. INTRODUCCIÓN

La solución de la mayoría de estos problemas se puede lograr mediante el uso de catalizadores heterogéneos, que pueden ser recuperados fácilmente al final de la reacción, y ser utilizados en sucesivos ciclos de reacción, sin ningún tratamiento previo. Además, los catalizadores heterogéneos no son corrosivos. Estos catalizadores están constituidos por diferentes mezclas de metales alcalino-térreos en forma de óxidos y/o carbonatos. Entre los catalizadores heterogéneos, el óxido de calcio es el más estudiado, ya sea puro o soportado en diversos materiales (sílice y alúmina, etc.) y ha demostrado ser muy recomendable debido a la posibilidad de su reutilización en la transesterificación de aceite de soja para producir biodiésel (Chouhan & Sarma, 2011; Viola et al., 2012).

Por otra parte, sin emplear ningún catalizador pero en condiciones supercríticas (350 a 400 °C y presión 65 mPa) y con una elevada relación molar de alcohol:aceite (42:1), se consigue que la reacción se lleve a cabo en sólo 4 minutos. Así, en condiciones no catalíticas, pero con metanol en condiciones supercríticas, el proceso implica operar en condiciones extremas de temperatura y altas presiones, lo que limita su aplicación a nivel industrial, debido a que los costes de instalación y funcionamiento son muy altos, con un elevado consumo energético. Es por ello que, la construcción de una planta industrial con esta tecnología es actualmente inviable desde el punto de vista económico (Anitescu & Bruno, 2012; A. Demirbas, 2006; Patil, Deng, Rhodes, & Lammers, 2010; Quesada-Medina & Olivares-Carrillo, 2011). Por lo tanto, la producción de biodiésel a nivel industrial hasta el momento se desarrolla mediante el uso de catalizadores básicos homogéneos, tales como NaOH, KOH o metóxidos potásico o sódico, generando glicerina como principal producto secundario de la reacción de metanolisis.

1.3. PROBLEMATICA ACTUAL PARA LA PRODUCCIÓN INDUSTRIAL DEL BIODIÉSEL CONVENCIONAL

1.3.1 FORTALEZAS Y DEBILIDADES EN LA PRODUCCIÓN INDUSTRIAL DEL BIODIÉSEL CONVENCIONAL.

La producción industrial del biodiésel en la actualidad se lleva a cabo mediante la transesterificación de triglicéridos de muy diferente origen con metanol, utilizando un catalizador alcalino en fase homogénea, para producir ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMEs) y glicerol. En este proceso, con el fin de aumentar el rendimiento del proceso, el alcohol se utiliza en exceso con respecto a las cantidades molares estequiométricas. Debido a esto, como producto de la reacción se obtienen dos fases inmiscibles (**Figura 1.6**), una superior, que contiene el biodiésel, formado por los ésteres metílicos de los ácidos grasos (FAMEs), y una fase inferior, donde se disuelve la glicerina en el exceso de alcohol utilizado.

Tras separar por decantación el biodiésel (**Figura 1.6**), se puede aislar la glicerina de la mezcla de reacción y recuperar por destilación el alcohol en exceso, para ser reutilizado. Sin embargo, esta aparente fácil solución oculta dos grandes inconvenientes, consecuencia de la solubilidad parcial del biodiésel en la solución alcohólica que contiene la glicerina, y también de la glicerina en la mezcla de biodiésel. Esto obliga a la realización de una operación de lavado del biodiésel con agua para limpiarlo de glicerina (impureza que provoca daños en el motor) y a la obtención de una glicerina fuertemente contaminada por los FAEE's o FAME's, disueltos en el alcohol. En efecto, la limpieza de la glicerina obtenida es un proceso complejo que

1. INTRODUCCIÓN

encarece de forma importante la obtención de una glicerina con una pureza adecuada (90 %) para su comercialización. De hecho, este producto ya se está gestionando como un residuo orgánico, empleándolo para compostaje (con o sin aprovechamiento del metano) o incineración en cementeras.

El proceso, que a escala de laboratorio parece simple, a escala industrial es necesario realizar una serie de etapas de purificación con el fin de cumplir con las cualidades (ASTM D 6751 y EN 14214), que requieren un mayor tiempo de reacción y mayor complejidad de operación (Y.-H. Chen, Huang, Lin, & Shang, 2010). Por otra parte, el proceso industrial convencional conlleva una grave corrosión del equipo, causado por el tratamiento ácido-base que requieren las aguas residuales y que contienen elevadas concentraciones de sales. Esto provoca un aumento en los costos de capital y de operación, de modo que los gastos generales de producción de biodiésel sigue siendo mayor que el del combustible diésel de origen (Di Serio, Tesser, Pengmei, & Santacesaria, 2008).

Así, en la actualidad se emplean catalizadores básicos homogéneos, que dan lugar a velocidades de reacción y rendimientos adecuados del producto. La reacción se lleva a cabo a temperaturas inferiores al punto de ebullición del metanol y a presión atmosférica, lo que comparativamente reduce los costes operativos y de capital asociados con la producción de biodiésel. Aun así, los catalizadores básicos en fase homogénea presentan desventajas tales como la corrosión del equipo y la necesidad de eliminar las elevadas cantidades de sales inorgánicas presentes en las aguas residuales generadas en el proceso (Vicente, Martinez, & Aracil, 2004).

Además, en presencia de ácidos grasos libres (FFA), los hidróxidos alcalinos conducen a la formación de jabón, lo que reduce el rendimiento en FAME. A este respecto, el proceso está lejos de ser respetuoso con el medio ambiente, dado que la

1. INTRODUCCIÓN

mezcla final de los productos de reacción necesita ser separada, neutralizada y lavada a fondo, generando una gran cantidad de residuos constituidos por sales alcalinas que, de ser purificados previamente, contaminan las agua de los vertidos, reduciendo al mismo tiempo la calidad de la glicerol obtenido como subproducto. El catalizador homogéneo tampoco puede ser reciclado. Estos problemas contribuyen en una parte importante al aumento de los costos de producción de biodiésel (Liu, He, Wang, Zhu, & Piao, 2008). A efectos de valoración de la complejidad del proceso, se representa en la **Figura 1.7**, el esquema de funcionamiento y el balance de materia, a escala de planta piloto, de una planta de transesterificación de un aceite no comestible, como es la jatrofa (*Jatropha curcas*) (Calero et al., 2015; El Diwani, Attia, & Hawash, 2009).

Es por esto que, para reducir los costos, una parte importante de la I+D en este campo se dirige al desarrollo de formas innovadoras en la fabricación de biodiésel. Así se está investigando la viabilidad de procesos continuos para la producción industrial de biodiésel, bien utilizando catalizadores básicos homogéneos como el metóxido de sodio o hidróxido de sodio (Behzadi & Farid, 2009; Guan et al., 2010), o heterogéneos (Meng, Tian, Li, Wang, & Zhang, 2013; Son & Kusakabe, 2011). Sin embargo, los inconvenientes más importantes en la fabricación industrial de biodiésel siguen sin solución. En este sentido, se hace necesario emplear un exceso de metanol con el fin de desplazar el equilibrio hacia la producción de FAMES en el proceso por pasos (**Figura 1.4**) obteniéndose siempre glicerol como principal producto secundario. La glicerina se obtiene disuelta en el exceso de metanol empleado, junto con otra pequeña cantidad de otros sustratos y subproductos.

La masa de glicerina bruta que se obtiene constituye aproximadamente el 12% en peso de la masa de reacción obtenida. En la fase metanólica el contenido de glicerina pura es del orden de un 60-70% en peso. Así que, además de las impurezas alcalinas que necesitan ser eliminadas, la glicerina es el principal inconveniente del

1. INTRODUCCIÓN

método convencional, no sólo porque supone una disminución en el rendimiento atómico del proceso, sino también debido a la necesidad de limpiar el biodiésel obtenido, ya que se encuentra contaminado de glicerina y también de las impurezas alcalinas residuales. Para ello se requieren varias etapas de lavado consecutivos, en los que se gasta mucha agua, para conseguir la eliminación completa de la glicerina y demás impurezas (Atadashi, Aroua, Aziz, & Sulaiman, 2012; Hasheminejad, Tabatabaei, Mansourpanah, Far, & Javani, 2011; Saleh, Dube, & Tremblay, 2011).

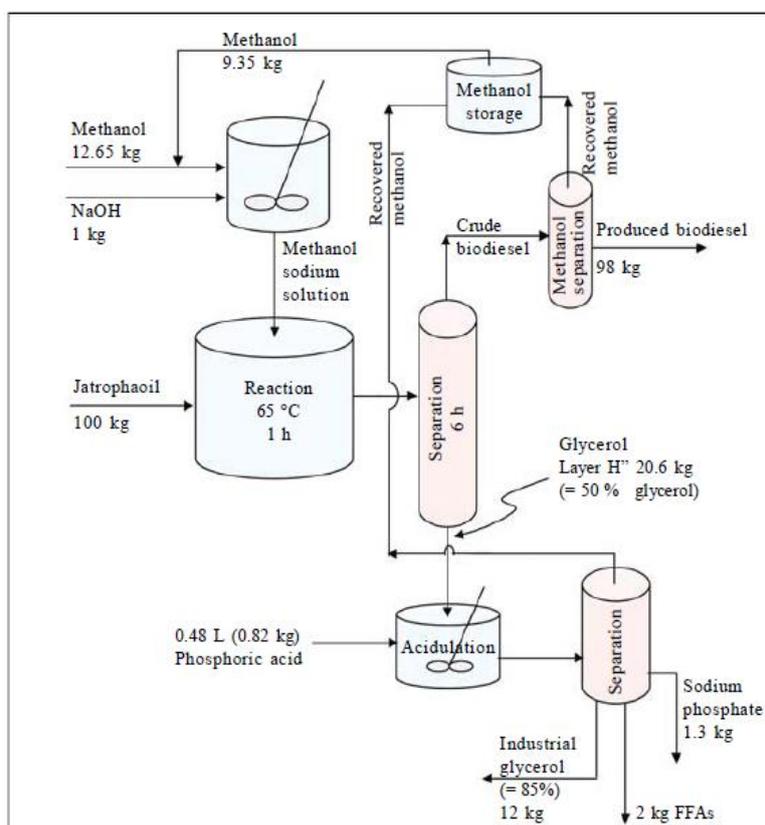


Figura 1.7. Balance de materia y esquema de funcionamiento de una planta piloto para la transesterificación de aceite de Jatropha, usando NaOH (1%) como catalizador (Calero et al., 2015; El Diwani et al., 2009).

1. INTRODUCCIÓN

Además, este proceso tiene otros inconvenientes debido a su carácter homogéneo, que conlleva la pérdida del catalizador en cada reacción, y la necesidad de eliminar la gran cantidad de sales generadas en el proceso de neutralización del catalizador fuertemente básico empleado. Esto supone varias etapas de limpieza, incluyendo la neutralización y lavado del biodiésel, con el consiguiente consumo de grandes cantidades de agua que posteriormente deberán tratarse para eliminar el gran contenido en sales que se obtienen. Todo ello, inevitablemente aumenta el costo del proceso y merma además la calidad de la glicerina obtenida como subproducto al estar contaminada con sales difíciles de eliminar, debido a su alta solubilidad en la glicerina.

El proceso estándar de una planta de biodiésel convencional (Oh et al., 2012), por tanto, incorpora una reacción de transesterificación, completada con los procesos que se muestra en el diagrama recogido en la **Figura 1.8**. El proceso de reacción se lleva a cabo en un reactor con agitación constante a una temperatura de 60 °C. El glicerol obtenido se separa por decantación y el metanol en exceso se recupera por destilación, sin embargo el biodiésel, de la fase superior, contiene los residuos del catalizador alcalino, que deben ser neutralizados y eliminados antes de su uso. La purificación del biodiésel se lleva a cabo habitualmente por neutralización y lavado con agua caliente para eliminar todas las impurezas. Después de lavar el biodiésel, éste se somete a secado en un evaporador para eliminar el agua residual que puede contener. Otra alternativa para la purificación del biodiésel es el uso de resinas que absorben las impurezas. Estas se alojan en una columna por la que se hace circular un flujo de biodiésel. Algunas resinas son susceptibles de ser sometidas a un proceso de limpieza mediante lavado, para ser reutilizadas de nuevo.

1. INTRODUCCIÓN

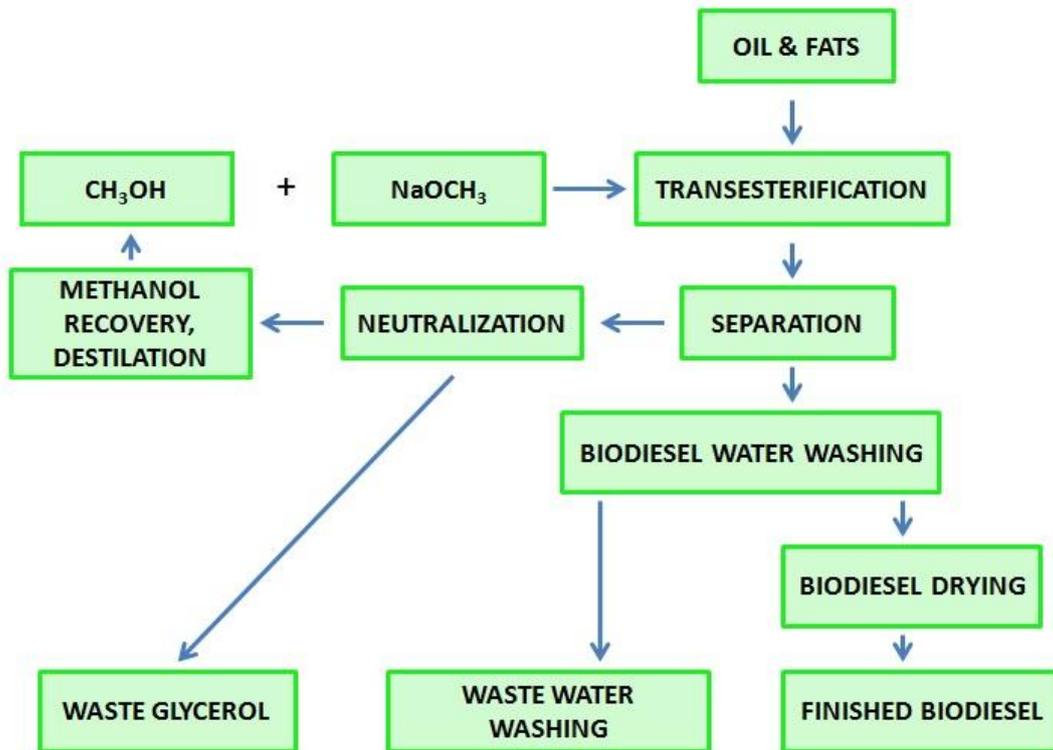


Figura 1.8. Esquema general del proceso de producción industrial de biodiésel convencional mediante catálisis básica.

La relativamente gran cantidad de glicerina obtenida en la producción del biodiésel convencional (EN 14214), representa una notable pérdida de rendimiento del proceso, ya que el mercado está ya prácticamente inundado por la producción de glicerina, precisamente obtenida como subproducto en la fabricación de biodiésel (Corma, Huber, Sauvanaud, & O'Connor, 2007; Leoneti, Aragao-Leoneti, & Walter Borges de Oliveira, 2012; Rahmat, Abdullah, & Mohamed, 2010). Pero la generación de glicerina como producto de reacción no sólo supone una disminución del rendimiento, siempre superior al 12% en peso nominal, debido a la obtención de glicerol, sino que la fase biodiésel (FAME) queda contaminada por una pequeña cantidad de glicerina que

1. INTRODUCCIÓN

hay que eliminar. La operación de eliminación de la pequeña cantidad de glicerina presente en el biodiésel es un proceso ineludible, debido a su capacidad de reacción con el oxígeno a alta temperatura en el interior del motor, donde podría producir por deshidratación acroleína, que se puede polimerizar (**Figura 1.9**) causando graves problemas a largo plazo en el motor.

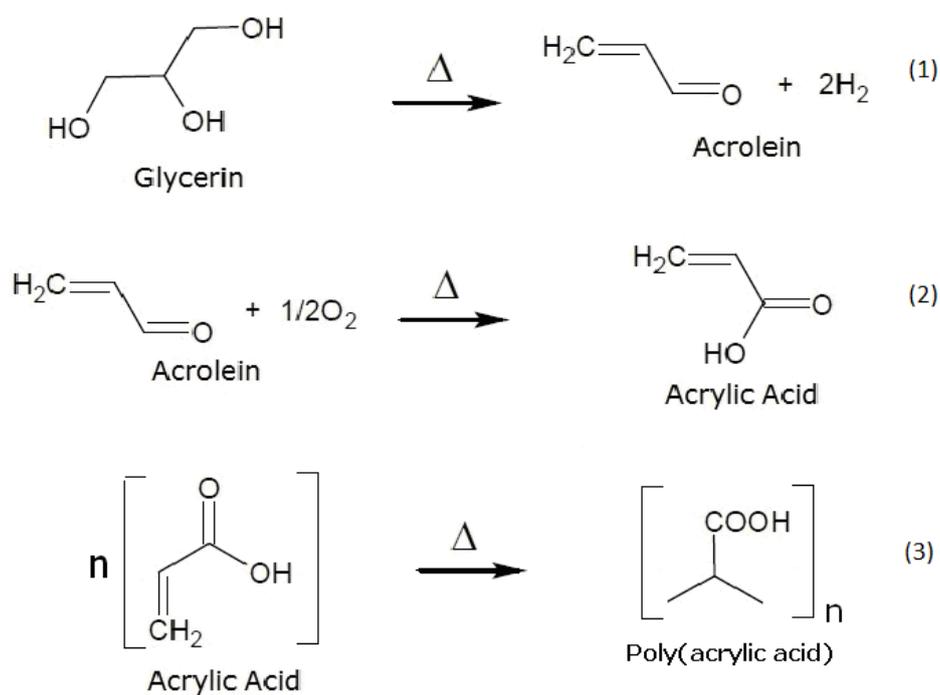


Figura 1.9. Reacciones de deshidratación (1), oxidación (2) y polimerización (3) que experimenta la glicerina residual presente en el biodiésel, dentro de un motor diésel.

Lo más característico es la formación de coque por calcinación de los polímeros que se van formando a partir de la glicerina. Este coque generará depósitos carbonosos sobre los inyectores, pistones y válvulas en los motores (**Figura 1.10**), lo

1. INTRODUCCIÓN

que reduce su eficacia e incluso su vida útil (Atadashi, Aroua, & Aziz, 2010; Jayed et al., 2011; Katryniok, Paul, Belliere-Baca, Rey, & Dumeignil, 2010; Palit, Mandal, Ghosh, Bhowal, & Asme, 2009).

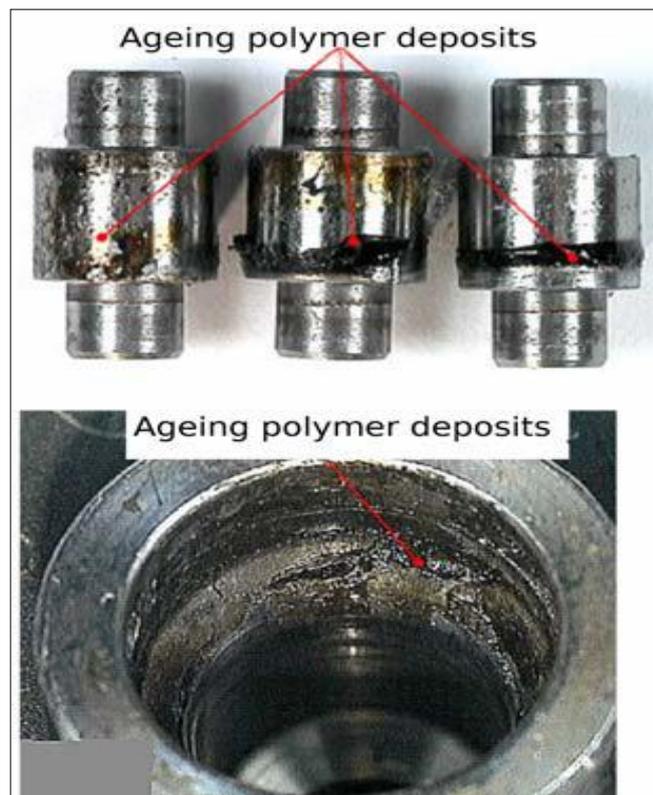


Figura 1.10. Deposición de restos carbonosos en diversas partes de un motor diésel ocasionados por el uso de biodiésel con un elevado contenido en glicerina.

1.3.2. ALTERNATIVAS TECNOLÓGICAS EN ESTUDIO PARA ATENUAR LOS EXCEDENTES DE GLICEROL OBTENIDOS EN LA PRODUCCIÓN INDUSTRIAL DE BIODIÉSEL.

Con independencia del elevado coste de producción asociado a la limpieza del glicerol, obtenido como subproducto, la dificultad más importante para la sustitución de una parte de los combustibles fósiles por biodiésel, sería la extraordinaria cantidad de glicerina que se produciría. Así, la sustitución de sólo un 10% en peso de los 90 millones de barriles de petróleo, transformados en combustibles líquidos actualmente consumidos por día, supondría la generación de 160.000 toneladas de glicerina por día, en todo el mundo, de modo que el exceso de glicerina generado podría convertirse en un problema medioambiental, ya que se trata de un residuo que ni puede ser vertido al medio ambiente (Mota, da Silva, Rosenbach, Costa, & da Silva, 2010), ni hay demanda suficiente para su transformación en otros productos. En efecto, las tecnologías actualmente en estudio no permiten aun emplear la glicerina como materia prima competitiva para la generación de otros productos de interés, demandados por el mercado, pues su eficiencia y rentabilidad aún son demasiado bajas. De hecho, el gran excedente de glicerina es en la actualidad un importante factor limitante en la producción industrial de biodiésel (Stelmachowski, 2011).

El método más simple actualmente empleado para la eliminación de la glicerina bruta es su combustión, se trata de un proceso que aporta ciertas ventajas, ya que no requiere ninguna purificación, lo que no aumenta de forma notable el coste del método. Sin embargo, este proceso no es fácil desde el punto de vista tecnológico. Además, el calor de combustión es dos veces menor que el de los combustibles fósiles, pero es comparable con el calor de combustión de la mayoría de otros tipos de biomasa (por ejemplo, madera o paja). El coste del transporte es relevante para su aprovechamiento.

1. INTRODUCCIÓN

El valor calorífico es menor debido a la cantidad relativamente grande de agua que se obtiene. Además, el agua hace que la combustión de glicerol muy difícil debido a que conduce a la inertización de la llama en los quemadores y la formación de grandes cantidades de negro de carbono. En la práctica, para poder llevar a cabo el proceso es esencial realizar una co-combustión de la glicerina con otros combustibles líquidos, utilizando quemadores especiales. Es por esto que este proceso de co-combustión de la glicerina todavía no se ha llevado a cabo a gran escala (Stelmachowski, 2011).

Dada la urgencia en la resolución del problema, ya existente, de los excedentes de glicerina, hay en curso una gran cantidad de líneas de investigación para obtener procesos innovadores que permitan la rentabilización de la glicerina obtenida como subproducto en la síntesis del biodiésel. Los numerosos métodos ya descritos que utilizan la glicerina residual como materia prima se pueden clasificar de acuerdo a los productos obtenidos, o bien por el tipo de tecnología que se aplica (Y. Zheng, Chen, & Shen, 2008).

Así, hay una serie de procesos químicos y biotecnológicos o procesos de oxidaciones catalíticas selectivas que describen la utilización de glicerina para lograr productos de química fina, tales como diferentes monómeros para la producción de polímeros de alto consumo, como la acroleína (Ulgen & Hoelderich, 2009) de alto valor añadido; alcoholes, en particular 1,2-propanodiol (Guo et al., 2009); 1,3-dicloro-2-propanol (Luo, You, & Li, 2009) o epiclorhidrina (Santacesaria, Tesser, Di Serio, Casale, & Verde, 2010) obtenido por cloración; éteres de terc-butanol, utilizados como aditivos para combustibles, como los éteres de tri-terc-butilo o éteres de di-terc-butilo obtenidos por eterificación (Frusteri et al., 2009), monoacilglicerol y diacilglicerol obtenidos por esterificación (Sakthivel, Nakamura, Komura, & Sugi, 2007) o 1,2-

1. INTRODUCCIÓN

propanodiol y 1, 3-propanodiol obtenido por reducción (Akiyama, Sato, Takahashi, Inui, & Yokota, 2009).

También se han descrito un gran número de productos que se puede obtener por oxidación selectiva de glicerina en fase gaseosa o líquida, con la ayuda de diferentes tipos de catalizadores (Liang et al., 2009; Prati, Spontoni, & Gaiassi, 2009; Zope & Davis, 2009). También se ha estudiado la pirólisis y gasificación de la glicerina a 650-800 °C a presión atmosférica para la generación de hidrógeno (Fernandez, Arenillas, Diez, Pis, & Menendez, 2009), así como su reformado para obtener hidrógeno y/o monóxido de carbono y diversos hidrocarburos. Dependiendo de la fuente de calor y los reactivos, el proceso puede ser operado como un reformado con vapor en la fase de gas (con o sin catalizadores) o en la fase acuosa (fase acuosa reformado; APR) y como un proceso autotérmico en la fase acuosa (Adhikari, Fernando, & Haryanto, 2009; Adhikari et al., 2008; Kunkes, Soares, Simonetti, & Dumesic, 2009).

Así mismo, se ha descrito la conversión fotocatalítica de la glicerina en hidrógeno, en presencia de diferentes catalizadores metálicos soportados (Gombac et al., 2010). También se ha descrito la bioconversión de la glicerina (y otros residuos orgánicos) en hidrógeno (Siles, Martin, Chica, & Martin, 2010) o en otras sustancias químicas útiles como β -caroteno (Mantzouridou, Naziri, & Tsimidou, 2008), o como una fuente de carbono en el proceso de fermentación utilizando microorganismos (Athalye, Garcia, & Wen, 2009; Celik, Ozbay, Oktar, & Calik, 2008).

Tenemos por tanto que, al menos a escala de laboratorio, según se resume en la **Tabla 1.2**, hay descritas diversas tecnologías que, a partir del glicerol, pueden conducir a la fabricación de productos convencionales que actualmente se obtienen por otras tecnologías, pero que presentan por el momento menor rentabilidad en la

1. INTRODUCCIÓN

producción de dichos productos. Así, por el momento, es muy difícil de considerar de forma realista la conversión de glicerina en productos útiles en química fina, con procesos capaces de compensar el costo añadido de la limpieza del biodiésel, obtenido mediante el procedimiento de transesterificación convencional (Hajek & Skopal, 2010).

Sin embargo, para garantizar un proceso adecuado para la sustitución de combustibles fósiles por biocombustibles, es necesario no sólo garantizar la existencia de suficiente cantidad de aceites y grasas para su utilización como materia prima, además de un método eficiente para la producción de biocombustibles, sino que también es imprescindible la utilización rentable de todos los subproductos y desechos (como serían las tortas de semillas oleaginosas y la glicerina en bruto) que se generan durante el proceso de producción.

Es decir, el proceso ha de ser rentable en cada una de las tres fases del procedimiento, no sólo en la obtención de las mejores materias primas a partir de la agricultura, empleando para ello las semillas más adecuadas para la obtención de aceites vegetales, comestibles y no comestibles, (aceites de colza, soja o girasol y jatrofa o ricino) y en el proceso de transesterificación, como por lo general es considerado en la mayoría de las publicaciones, sino también en la correcta gestión (económica y ambiental) de los residuos y subproductos generados en los dos procesos previos de obtención de la materia prima y su transformación en biodiésel.

En resumen, con independencia del debate abierto en relación con el uso de aceites comestibles para producir biodiésel en el largo plazo, quedan por resolver que metodología sería la más adecuada para producir el biodiésel, toda vez que no hay aún disponible a escala industrial un proceso adecuado para la valorización de las ingentes cantidades de glicerol que se producirían con la producción masiva de biodiésel.

1. INTRODUCCIÓN

Tabla 1.2. Productos obtenidos y alternativas tecnológicas, para hacer rentable el exceso de glicerina generado en la producción de biodiésel.

Producto	Tecnología	Ref.
Acroleína	Oxidación catalítica selectiva en catalizadores de WO ₃ / ZrO ₂	(Ulgen & Hoelderich, 2009)
1,2-Propanodiol	Hidrogenólisis en Co/ MgO	(Guo et al., 2009)
3-dicloro-2-propanol	Cloración de glicerol en ácido acético como catalizador	(Luo et al., 2009)
Epiclorohidrina	cloración de glicerol con ácido clorhídrico gaseoso	(Santacesaria et al., 2010)
Di-tert-butil eter	Esterificación catalítica heterogénea con alcohol terc-butilo con catalizadores ácidos soportados en sílice	(Frusteri et al., 2009)
Monolaurin and dilaurin (mono and diacylglycerols)	Esterificación con ácido láurico en un medio CO ₂ supercrítico (SCC) con aluminio y materiales mesoporosos circonio	(Sakthivel et al., 2007)
1,2-Propanodiol	Deshidratación-hidrogenación en fase vapor sobre catalizadores de cobre a presión atmosférica de hidrógeno	(Akiyama et al., 2009)
Acido Glicérico	Oxidación selectiva en una solución acuosa no básica a través de catalizadores de Pt de diferentes tamaño	(Liang et al., 2009)
Ácidos Glicérico y Tartrónico	Oxidación en presencia de O ₂ y un catalizador a base de oro	(Prati et al., 2009; Zope & Davis, 2009)
Gas de Síntesis (H ₂ + CO)	Pirólisis sobre catalizadores carbonosos	(Fernandez et al., 2009)
Hidrógeno	Reformado con vapor, reformado autotérmico, reformado en fase acuosa, reformado con agua supercrítica y reformado fotocatalítico	(Adhikari et al., 2009) (Adhikari et al., 2008) (Kunkes et al., 2009)
Metano	Digestión anaeróbica	(Siles et al., 2010)
Productos adicionales de valor añadido	Glicerol como fuente de carbono adicional para los procesos de fermentación por <i>Blakesleatrispora</i> , <i>Pichia pastoris</i> u hongos <i>Pythiumirregulare</i>	(Mantzouridou et al., 2008) (Celik et al., 2008) (Athalye et al., 2009)

1. INTRODUCCIÓN

Así, de llevar a cabo la producción de biodiésel prevista (**Tabla 1.3**), aplicando una tecnología convencional, se obtendría la producción total de glicerina mostrada en la **Tabla 1.3**. Pero es un hecho que, el mercado de la producción industrial de glicerina, dirigido durante años hacia la industria farmacéutica, se encuentra en la actualidad prácticamente saturado, por las grandes cantidades ya obtenidas, precisamente como subproducto en la fabricación de biodiésel.

Tabla 1.3. Evolución del consumo de biodiésel y generación de glicerina en Europa. Estimación basada en las directrices europeas para el fomento de biocarburantes (Datos de la Agencia Andaluza de la Energía).

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

A este respecto, las grandes cantidades de glicerina obtenida en los últimos años, han dado lugar a una caída dramática del precio de mercado de la glicerina, dado que los productos tradicionales obtenidos a partir de la glicerina no son suficientes para cubrir la creciente oferta devenida a causa de la producción actual de biodiésel, ya que en la actualidad hay un número muy limitado de patentes sobre nuevos métodos de aprovechamiento de la glicerina mediante su transformación en productos útiles y rentables, de forma que las investigaciones de estas tecnologías innovadoras se encuentran en la mayoría de los casos en una fase preliminar de la investigación.

1. INTRODUCCIÓN

Por esto, se considera que la producción industrial de biodiésel se está ralentizando por la carencia de nuevos métodos avanzados para la utilización de la glicerina cruda, que sean viables no sólo desde un punto de vista tecnológico, sino industrialmente posibles, al ser también rentables. Estos métodos deberían permitir la producción de mayores cantidades de productos químicos derivados de glicerina para poder incrementar la producción de biodiésel (Stelmachowski, 2011)

1.4. BIOCOMBUSTIBLES SIMILARES AL DIÉSEL FOSIL: "GREEN DIESEL"

Teniendo en cuenta los problemas que conlleva la producción masiva del biodiésel convencional, hay varios procedimientos alternativos que están actualmente en desarrollo para la conversión de grasas y aceites en biocombustibles de calidad para su aplicación en los motores actuales sin efectuar en ellos ninguna transformación. Así, como se ha puesto de manifiesto (**Figura 1.3**), además del uso directo de los aceites (puros o en forma de microemulsiones) existen diversas alternativas al proceso de transesterificación para obtener biocombustibles a partir de aceites vegetales, sin generar glicerina como residuo. Así, mediante diversos tratamientos (craqueo e hidrocrqueo) que transforman los aceites vegetales en mezclas de hidrocarburos muy similares a las que constituyen el diésel de origen fósil. Son los denominados diésel renovable, diésel verde o "green diesel".

En este sentido, hay descritos diversos procesos de craqueo (o pirólisis, hidrodesoxigenación o de hidrocrqueo) que se pueden utilizar para la obtención de combustibles similares al diésel fósil o petrodiesel. Una de las mejores soluciones posibles consistiría en realizar alguno de estos procesos, como el hidrotratamiento catalítico de aceites vegetales, en las mismas instalaciones de refinerías existentes, para el procesamiento del crudo petrolífero (Knothe, 2010). Este biocombustible ha ido ganando atención en los últimos años y puede ser llamado "diésel verde", un diésel renovable cuya composición se asemeja a la de combustible diésel derivado del petróleo. En consecuencia, las materias primas derivadas de material renovable se pueden convertir en hidrocarburos, similares a los presentes en los combustibles fósiles y evitando la presencia de glicerol, por un procedimiento que se denomina hidrocrqueo.

1. INTRODUCCIÓN

De hecho, la producción de combustibles de hidrocarburos a partir de aceites vegetales mediante un proceso que en ese momento ya se denominó cracking o craqueo, y que de hecho, en realidad precede al propio término biodiésel, acuñado en la década de los setenta. Este procedimiento de craqueo fue capaz de producir una variedad de productos, incluyendo la gasolina y los combustibles adecuados para los motores diésel, similares a los obtenidos del petróleo, que se obtuvieron mediante la descomposición (o fragmentación) de los aceites a altas temperaturas en presencia de hidrógeno, metodologías a las que se denominó con los términos de craqueo e hidrocrqueo, respectivamente (Knothe, 2010). Los trabajos pioneros en este campo, en los que se efectuó el craqueo de diversos aceites vegetales, se realizaron en China en la década de 1930, dando lugar a combustibles de emergencia, capaces de sustituir los combustibles convencionales derivados del petróleo durante la Segunda Guerra Mundial.

Desde entonces, se han descrito diferentes catalizadores que mediante un proceso de hidrotratamiento son capaces de transformar diversos aceites vegetales en alcanos normales, con puntos de ebullición en el rango de la gasolina o el diésel. Esto ha alcanzado especial relevancia en la última década, debido a la creciente preocupación por los recursos energéticos y el medio ambiente, que ha estimulado el interés en el estudio de fuentes alternativas de energía, capaces de proporcionar un sustituto del diésel fósil, con adecuada aplicación en motores de combustión interna, sin necesidad de llevar a cabo modificación alguna (Bezergianni, Kalogianni, & Dimitriadis, 2012; Carlos Serrano-Ruiz, Ramos-Fernandez, & Sepulveda-Escribano, 2012; Lapuerta, Villajos, Agudelo, & Boehman, 2011; Veriansyah et al., 2012; C. Wang et al., 2012).

Esta tecnología se ha extendido a la aplicación del tratamiento de hidrocrqueo con mezclas de aceites vegetales, con fracciones de crudo petrolífero pesado, de pesos

1. INTRODUCCIÓN

moleculares equivalentes en las refinerías de petróleo convencionales (Fogassy et al., 2010; Huber, O'Connor, & Corma, 2007; Mercader et al., 2010; Rana et al., 2013; Toth, Baladincz, Kovacs, & Hancsok, 2011). Por tanto, este procedimiento permite transformar los triglicéridos, obtenidos a partir de fuentes renovables, en combustible diésel de alta calidad, en las mismas instalaciones ya disponibles en las refinerías de petróleo convencionales, empleando los catalizadores específicos adecuados.

Así, mediante el hidrotratamiento de mezclas de aceite de colza y gas oil de destilación directa (con un contenido de azufre: 0,95 %) con un sistema catalítico consistente en sulfuros bimetalicos NiMoP/Al₂O₃, se obtuvo tanto la eliminación del azufre y nitrógeno, como la eliminación de los triglicéridos (por hidrogenación y descarboxilación), y en un grado más moderado, la hidrogenación de compuestos aromáticos (Kubicka & Kaluza, 2010). De esta manera, es posible obtener alcanos líquidos de carácter renovables por tratamiento de mezclas de aceites vegetales y gas oil pesado de vacío (HVO), en corriente de hidrógeno y los catalizadores convencionales actualmente empleados en las unidades de hidrocrackeo, como puede ser el catalizador de sulfuros bimetalicos NiMo/Al₂O₃ y muchos otros convencionales, operando en condiciones usuales de presión y temperaturas en el intervalo 300 - 450 °C.

La reacción descrita implica la hidrogenólisis de los enlaces C-C de los aceites vegetales, lo que conduce a una mezcla de alcanos de bajo peso molecular, por tres rutas diferentes: descarboxilación, descarboxilación e hidrodeseoxigenación, promovidas por catalizadores comerciales de hidrotratamiento del tipo NiMo presulfurados, soportados (Shi et al., 2012), que pueden ser empleados en una planta piloto con reactor de hidrotratamiento de lecho fijo (esquema en **Figura 1.11**), operando en el intervalo 330-390 °C, a 3 MPa y velocidad espacial 2 h⁻¹. Como subproductos se obtienen gases constituidos por H₂, CO, CO₂, O₂, N₂, H₂S, CH₄ e

1. INTRODUCCIÓN

hidrocarburos C_2-C_6 y un significativamente elevado rendimiento, del orden del 80% en peso, de hidrocarburos líquidos. Estos hidrocarburos líquidos obtenidos tienen un bajo índice de acidez, densidad y viscosidad adecuadas, así como un elevado índice de cetano. En este sentido, los catalizadores de hidrodesulfuración tradicionales, constituidos por sistemas bimetalicos sulfurados soportados del tipo $NiMo/Al_2O_3$, $CoMo/Al_2O_3$, y NiW/Al_2O_3 están siendo investigados en la actualidad para obtener diésel renovable en las instalaciones de las refinerías de petróleo convencionales.

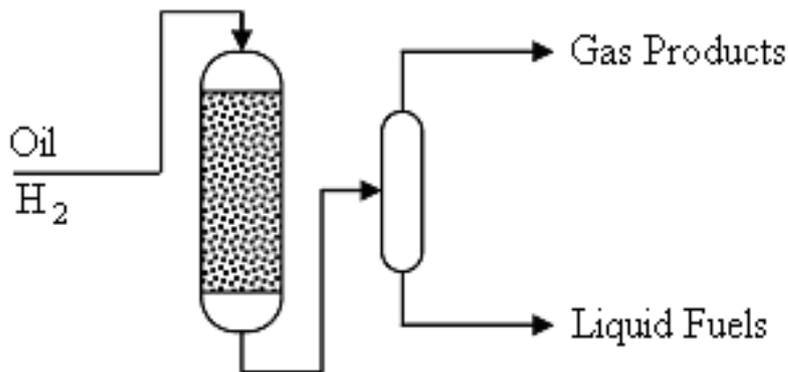


Figura 1.11. Producción de biodiésel de alta calidad a partir de aceites vegetales por hidrot ratamiento junto con hidrocarburos de petróleo en un reactor de lecho fijo, mediante el uso de un catalizador de hidrot ratamiento comercial de tipo NiMo presulfurado, operando a 350 °C.

En general, el proceso transcurre mediante una hidrogenación simple o hidrodesoxigenación (HDO), a través de un enol intermedio, que produce agua, propano y tres alcanos normales con la longitud correspondiente a las cadenas de los ácidos grasos que forman el aceite. Mediante esta reacción, un mol de triglicérido reaccionaría con 16 moles de hidrógeno (suponiendo cuatro dobles enlaces/mol),

1. INTRODUCCIÓN

formando seis moles de agua, un mol de propano y tres moles de una mezcla de hidrocarburos n-C₁₈ y n-C₂₂. También se produce un proceso de descarboxilación o eliminación de CO₂, en el que el triglicérido se divide en propano, dióxido de carbono y/o monóxido de carbono y en n-alcano con un átomo de C menos que el correspondiente a la longitud de los ácidos grasos. Para el aceite de colza, los n-alcanos obtenidos se encuentran en el intervalo n-C₁₇ y n-C₂₁ (Donnis, Egeberg, Blom, & Knudsen, 2009) [92].

En resumen, las unidades de hidrotratamiento de los diésel fósiles existentes en las refinerías, estaban inicialmente destinadas a reducir el contenido de azufre de los combustibles, para cumplir con las especificaciones vigentes en los diferentes países. Sin embargo, este proceso se ha convertido actualmente en una de las mejores tecnologías disponibles para la producción de biocombustibles diésel de alta calidad en las refinerías de petróleo convencionales, mediante el tratamiento de aceites vegetales o grasas animales con hidrógeno a presiones variables, en presencia de los mismos catalizadores metálicos soportados empleados en la desulfuración de los combustibles diésel de origen fósil. Estos combustibles diésel de alta calidad, se suelen denominar a menudo como diésel renovable o diésel verde, que contiene los mismos componentes que los presentes en el diésel fósil (Antonio Melero, Iglesias, & Garcia, 2012; Bezergianni & Dimitriadis, 2013; Naik, Goud, Rout, & Dalai, 2010; Rana et al., 2013; Satyarthi, Chiranjeevi, Gokak, & Viswanathan, 2013).

Esta metodología es especialmente útil para ser usado con aceites (no comestible) con un elevado contenido en ácidos grasos, ya que en medio básico conducen a la formación de jabones, consecuente pérdida de aceite y los problemas de la separación del producto durante la transesterificación catalítica homogénea convencional, con NaOH o KOH.

1. INTRODUCCIÓN

Sin embargo, hay una disminución en el rendimiento atómico del proceso (eficiencia atómica) porque hay una pérdida significativa de materia prima ya que el oxígeno presente en el triglicérido se elimina como CO_2 y H_2O (Donnis et al., 2009). En la práctica, se obtiene una pérdida completa de materia equivalente a la glicerina del triglicérido (como en la producción del biodiésel convencional), pero con esta tecnología se evitan las operaciones de limpieza de los biocombustibles, aunque también presentan menos poder lubricante que el biodiésel convencional. No obstante, además, de las ventajas económicas que se consiguen con el hidrotratamiento respecto al biodiésel convencional, obtenido por transesterificación con metanol, debido al menor coste de procesamiento, hay que considerar, la reducción de las emisiones de NO_x y la flexibilidad en la materia prima, ya que no presenta ningún tipo de limitaciones respecto al contenido en ácidos grasos libres presentes en la materia prima. Por esto se considera que esta tecnología de producción de biocombustibles desempeñará un papel importante en el suministro de una fuente sostenible de combustibles para el transporte durante las próximas décadas (No, 2014).

Las ventajas económicas que ofrezca esta tecnología, frente a los combustibles derivados del petróleo, u otros futuros biocombustibles avanzados, no están aún claras en este momento; sin embargo, un estudio de la cadena de valor de los diésel renovables, o verdes, ha puesto de relieve varios factores que tendrán un impacto importante en las economías de escala y las economía finales en este campo (Arbogast, Bellman, Paynter, & Wykowski, 2012). Estos factores incluyen la capacidad de aplicación de las refinerías ya existentes para el procesamiento de los aceites y las ventajas del uso de las capacidades logísticas existentes, especialmente para la comercialización de las producciones primarias. También, debe considerarse la capacidad para financiar el desarrollo del proceso y la actualización comercial

1. INTRODUCCIÓN

correspondiente, con sus riesgos asociados. Además, ya se encuentran disponibles la mayoría de las instalaciones necesarias capaces de operar a escala comparable a la utilizada en la industria actual de los combustibles a base de petróleo, con ahorros sustanciales.

Así, podemos concluir que la aplicación del método de co-procesamiento de aceites y grasas de cualquier calidad, junto con diésel fósil en instalaciones de hidrocrackeo, tiene notables ventajas sobre los métodos convencionales de producción de biodiésel actualmente aplicados, ya que aún no existen procedimientos adecuados para la gestión de la glicerina residual, producida en el proceso de transesterificación.

1.5. LIPASAS

Las lipasas (EC 3.1.1.3, triacilglicerol lipasa) son las enzimas que catalizan la hidrólisis de grasas y aceites con la posterior liberación de ácidos grasos libres, diglicéridos, monoglicéridos y glicerol. Están ampliamente distribuidos en plantas, animales y microorganismos, donde su función fisiológica es metabolizar lípidos. Estas enzimas se obtienen ya sea por extracción de tejido animal o vegetal o cultivo de microorganismos (Jaeger, Dijkstra, & Reetz, 1999).

Las lipasas son enzimas con un gran interés en química fina ya que presentan una amplia especificidad por sustratos muy diferentes, lo cual contrasta, en algunos casos, con una elevada regio y enantioselectividad. Estas propiedades han convertido a las lipasas en las enzimas con mayor uso en biotransformaciones, por ejemplo en resolución de mezclas racémicas. Estas enzimas, además de biocatalizar reacciones de esterificación y transesterificación en medios con bajo contenido acuoso, también llevan a cabo reacciones de hidrólisis (Jaeger & Eggert, 2002; A. Schmid, Hollmann, Park, & Buhler, 2002).

Los microorganismos son capaces de producir diferentes tipos de enzimas lipolíticas, incluyendo lipasas y estererasas. Las lipasas son capaces de actuar sobre acilgliceroles de cadena larga ($\geq C_{10}$), mientras que las estererasas actúan, preferentemente, sobre acilgliceroles de cadena corta ($\leq C_{10}$) (Jaeger et al., 1999). Sin embargo, la principal característica de las lipasas es su capacidad de activación en presencia de interfases hidrofóbicas, a lo cual se le denomina “activación interfacial” (Bastida et al., 1998). Esta activación interfacial puede ser promovida por diferentes interfases hidrofóbicas: gotas de aceite, soportes de superficie hidrofóbicas, burbujas de gas, proteínas hidrofóbicas, lipopolisacáridos, etc. (J. M. Palomo et al., 2003).

1. INTRODUCCIÓN

Las lipasas presentan un elemento diferenciador que no se conoce en otro grupo de enzimas. Dicho elemento es una “tapadera” o “lid”, formada por una porción helicoidal de la cadena polipeptídica, que se sitúa sobre el centro activo de la enzima en su conformación inactiva. Las lipasas presentan dos conformaciones diferentes, denominadas forma cerrada y forma abierta. Cuando el centro activo de la enzima está protegido del medio de reacción por la tapadera se considera que la enzima está inactiva (forma cerrada). Cuando la tapadera se desplaza y el centro activo queda expuesto al medio de reacción, la enzima adquiere la conformación activa (forma abierta). En medio acuoso, las moléculas de lipasas se encuentran en equilibrio entre estas dos formas, con el equilibrio desplazado hacia la forma cerrada. Este intercambio entre la forma abierta y la cerrada está acompañada de complejos cambios conformacionales (Derewenda, Brzozowski, Lawson, & Derewenda, 1992) (**Figura 1.12**). Tras la activación interfacial se forma una cavidad o hueco, denominado oxianión, donde se va a producir la interacción entre el sustrato y el sitio catalítico.

El centro catalítico de las lipasas está constituido por una triada catalítica compuesta por residuos de Ser, His y Asp. El residuo de serina normalmente aparece en el centro del pentapeptido conservado Gly-X-Ser-X-Gly. El oxianión, nombrado anteriormente, está formado por 6 o 7 residuos aminoácidos y suele estar situado a unos 60-100 aminoácidos del centro activo (Jaeger et al., 1994).

Las lipasas constituyen un grupo de biocatalizadores muy versátiles puesto que son estables en disolventes orgánicos, no requieren cofactores, poseen un amplio rango de especificidad de sustrato y presentan una alta enantioselectividad (Jaeger & Eggert, 2002). Además, pueden ser producidas en grandes cantidades, ya que la mayoría se obtienen con gran rendimiento de microorganismos tales como hongos o bacterias. La resolución de la estructura tridimensional de algunas lipasas también está

1. INTRODUCCIÓN

facilitando considerablemente el diseño de estrategias que conducen a una mejora en las propiedades catalíticas de estas enzimas (Jaeger & Eggert, 2002).

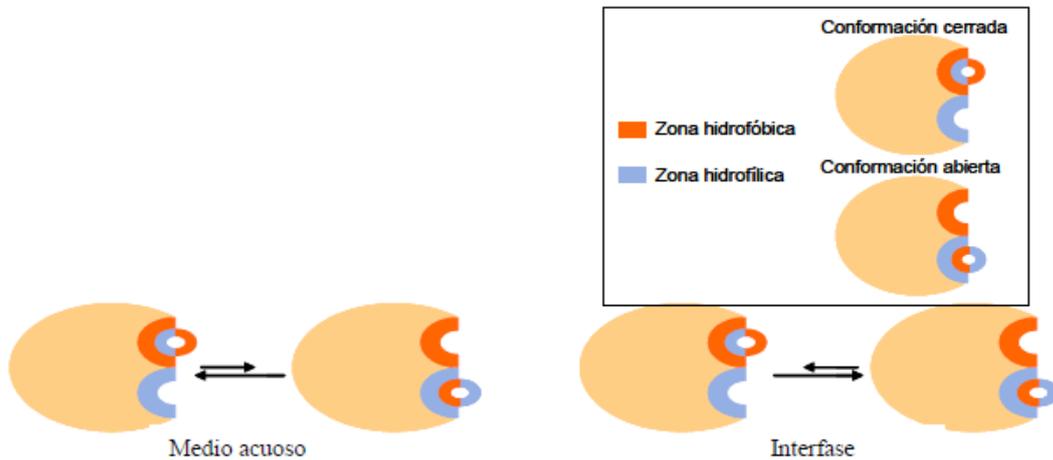


Figura 1.12. Mecanismo de activación interfacial de las lipasas.

No obstante, si bien se conoce perfectamente el mecanismo biocatalítico de las reacciones de hidrólisis llevadas a cabo por lipasas (Bornscheuer, 2002), se desconoce el mecanismo de catálisis que utilizan las lipasas para efectuar las reacciones de transesterificación.

La mayoría de las lipasas utilizadas en biotecnología son de origen microbiano. Algunas de las reacciones químicas más comúnmente catalizadas por lipasas bacterianas son, entre otras, la esterificación, transesterificación e interesterificación que serían las reacciones de interés para la producción de biodiésel.

Sin embargo, determinados factores, como el hecho de que la mayoría de las enzimas no son estables en las condiciones del proceso y, por otra parte, son difícilmente reutilizables, han contribuido a que su uso industrial no se haya

1. INTRODUCCIÓN

generalizado (Sheldon, 2007). La inmovilización de las enzimas pretende constituir una ayuda para superar estos inconvenientes. Se trata de un proceso mediante el cual se restringen, completa o parcialmente, los grados de libertad de movimiento de enzimas, orgánulos, células, etc. por su unión a un soporte.

Como ventajas del empleo de enzimas inmovilizadas hay que destacar el aumento de la estabilidad de la enzima, la posible reutilización del derivado, por lo que disminuyen los costes del proceso y la posibilidad de diseñar un reactor enzimático de fácil manejo y control, adaptado a la aplicación de la enzima inmovilizada (S. Hama et al., 2006; Shimada et al., 1999; T. W. Tan, Nie, & Wang, 2006).

Desafortunadamente, los procesos de inmovilización también tienen una serie de inconvenientes: dada la alteración de la conformación de la enzima respecto a su estado nativo, la gran heterogeneidad del sistema enzima-soporte donde pueden existir distintas fracciones de proteínas inmovilizadas con un diferente número de uniones al soporte y la pérdida de actividad de la enzima durante la inmovilización (Martinek & Mozhaev, 1985). Por lo general, la inmovilización de lipasas puede permitir una mejora significativa de su estabilidad, lo que hace posible su empleo en la producción industrial de biodiésel. Además, la unión de lipasas a soportes adecuados puede mejorar en gran medida el desarrollo de reactores industriales, permitiéndonos una continua reutilización de estos interesantes biocatalizadores (R. Fernandez-Lafuente, Armisen, Sabuquillo, Fernandez-Lorente, & Guisan, 1998).

La complejidad del mecanismo de acción de las lipasas provoca dificultades a la hora de entender y controlar su comportamiento en síntesis orgánica, tanto en el laboratorio como a escala industrial. Sin embargo, este mecanismo de acción de las lipasas puede ser utilizado como una herramienta para desarrollar nuevos y simples

métodos de inmovilización, en los cuales la activación interfacial juega un papel importante (Bastida et al., 1998).

1.5.1. ESTRUCTURA DE LAS LIPASAS.

Las estructuras tridimensionales de muchas lipasas han sido determinadas por cristalografía de rayos X. La **Tabla 1.4** (Kapoor & Gupta, 2012) muestra una ilustrativa lista de lipasas cuyas estructuras de rayos X se han determinado.

En base a estos estudios de Rayos X, se pueden identificar las siguientes características estructurales comunes a todas las lipasas:

1. Todas las lipasas son miembros de la familia " α/β -hidrolasa", es decir, tienen una estructura que se compone de un núcleo de predominantemente láminas β paralelas rodeado por α -hélices (Carrasco-Lopez et al., 2009; Ollis et al., 1992; Schrag & Cygler, 1997).
2. El residuo de serina nucleófilo activo se basa en una cadena que hace un giro entre una lámina β y una α -hélice en una secuencia de pentapéptido altamente conservada Gly-X-Ser-X-Gly, (Carrasco-Lopez et al., 2009; Ollis et al., 1992; Schrag & Cygler, 1997) formando un característico motivo, giro $\alpha\beta$, que se denomina "codo nucleofílico" (Carrasco-Lopez et al., 2009; Ollis et al., 1992; Schrag & Cygler, 1997). Sin embargo, la Lipasa B de Candida Antarctica (CALB) no tiene la secuencia de pentapéptido conservado Gly-X-Ser-X-Gly, alrededor del sitio activo, presente en la mayoría de las otras lipasas (Uppenberg, Hansen, Patkar, & Jones, 1994). Su estructura se representa en la **Figura 1.13**.

1. INTRODUCCIÓN

Tabla 1.4. Lipasas representativas cuyas estructuras se han determinado mediante rayos X, junto con su especificidad (www.pdb.org).

Fuente de Lipasa	Epecificidad	Referencias
Bacteriana		
<i>Bacillus thermocatenulatus</i>	1,3-Regiospecífica	(Krishna & Karanth, 2002)
<i>Burkholderia glumae</i> (<i>Pseudomonas glumae</i>)	No específica	(R. D. Schmid & Verger, 1998)
<i>Burkholderia cepacia</i> (<i>Pseudomonas cepacia</i>)	No específica	
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-
<i>Chromobacterium viscosum</i>	No específica	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i> ^a	No específica	
Fúngica		
<i>Aspergillus niger</i> ^a	1,3-Regiospecífica	
<i>Candida rugosa</i> (<i>Candida cylindracea</i>)	No específica	
<i>Candida antarctica A</i> ^b	Trans specific	(Krishna & Karanth, 2002)
<i>Candida antarctica B</i> <i>Geotrichum candidum</i>	1,3-Regiospecífica cis- Δ^9 (unsaturated fatty acids)	(R. D. Schmid & Verger, 1998)
<i>Mucor javanicus</i> ^a	1,3-Regiospecífica	(Hills, Kiewitt, & Mukherjee, 1990)
<i>Penicillium camembertii</i> (<i>Penicillium cyclopeum</i>)	1,3-Regiospecífica	(Krishna & Karanth, 2002)
<i>Penicillium expansum</i>	-	-
<i>Rhizomucor miehei</i> (<i>Mucor miehei</i>)	1,3-Regiospecífica	-
<i>Rhizopus delemar</i>	1,3-Regiospecífica	(Hills et al., 1990)
<i>Rhizopus oryzae</i>	1,3-Regiospecífica	(Krishna & Karanth, 2002)
<i>Rhizopus niveus</i>	1,3-Regiospecífica	(B. D. Ribeiro, de Castro, Coelho, & Freire, 2011)
<i>Thermomyces lanuginosa</i> (<i>Humicola lanuginosa</i>)	1,3-Regiospecífica	(Roberto Fernandez-Lafuente, 2010) ^c
<i>Yarrowia lipolytica</i>	1,3-Regiospecífica	(B. D. Ribeiro et al., 2011)
Planta		
<i>Brassica napus</i> (colza) ^a	1,3-Regiospecífica	(Hills et al., 1990)
Animal		
<i>Canis lupus familiaris</i> (perro)	-	-
<i>Equus caballus</i> (equino)	-	-
Lipasa pancreática porcina (PPL)	1,3-Regiospecífica	(R. D. Schmid & Verger, 1998)
Lipasa pancreática humana (HPL)	1,3-Regiospecífica	(R. D. Schmid & Verger, 1998)

^aLas estructuras de rayos X para estas lipasas no se han determinado.

^bInformación sobre la determinación de la estructura de rayos X de esta lipasa se ha tomado de Ref. (Ericsson et al., 2008).

^cSegún Ref , (Roberto Fernandez-Lafuente, 2010 La lipasa de *Humicola lanuginosa* ha sido clasificado como no específica. De acuerdo a muchos otros artículos (Macrae & Hammond, 1985; Saxena et al., 1999; Y. Wang, Wu, & Zong, 2008) y la página web de la empresa distribuidora <http://www.enzymtech.com/files/novolipasespec.pdf>, TLL es una lipasa 1,3-específica.

1. INTRODUCCIÓN

3. El sitio activo de las lipasas está formada por una tríada catalítica formada por los aminoácidos serina, histidina y ácido aspártico/ácido glutámico (Brady et al., 1990; Carrasco-Lopez et al., 2009; Winkler, Darcy, & Hunziker, 1990). Los centros activos de lipasas y proteasas son químicamente similares pero estructuralmente diferentes. Así, el grupo seril hidroxilo en las lipasas está orientado de manera diferente que en las serina proteasas, lo que resulta en una estereoquímica invertida de la triada catalítica (Dodson, Lawson, & Winkler, 1992).
4. Presencia de una tapa o solapa compuesta de una secuencia peptídica anfífilica de α -hélice que cubre el sitio activo (R. D. Schmid & Verger, 1998). En el caso de la lipasa de *Thermocatenuatus Geobacillus*, la tapa tiene una estructura compleja que implica un gran porcentaje de los aminoácidos de la enzima y forma una doble tapa (Carrasco-Lopez et al., 2009). La Lipasa B de *C. antarctica* tiene una tapa muy pequeña y sencilla que no aísla completamente el centro activo de la enzima en la forma cerrada (Uppenberg et al., 1994). La Lipasa del páncreas del "cerdo-guinea" tiene una "mini-tapa" que se compone de sólo cinco aminoácidos (Hjorth et al., 1993).
5. El centro activo tiene cuatro puntos de unión del sustrato, para los triglicéridos: un hueco de oxianión y tres "bolsillos" para acomodar los ácidos grasos unidos en las posiciones sn-1, sn-2, y sn-3. Dos amidas forman la columna vertebral de un residuo en la Región N-terminal de la lipasa y el terminal C de la serina catalítica vecina forman el hueco oxianión (Lang & Dijkstra, 1998; Lang, Mannesse, De Haas, Verheij, & Dijkstra, 1998). Pleiss et al. subdividieron las lipasas en tres subgrupos en base a la geometría del sitio de unión (Pleiss, Fischer, & Schmid, 1998)

1. INTRODUCCIÓN

- i. Lipasas con un sitio de unión hidrofóbico, con una forma de "grieta" situada cerca de la superficie de la proteína (lipasas de *Rhizopus* y *Rhizomucor*)
- ii. Otras Lipasas lo presentan con forma de "embudo" (lipasas de *C. antarctica*, *Pseudomonas* y el páncreas de mamíferos)
- iii. Lipasas con un sitio de unión tipo "túnel" (lipasa de *Candida rugosa*).

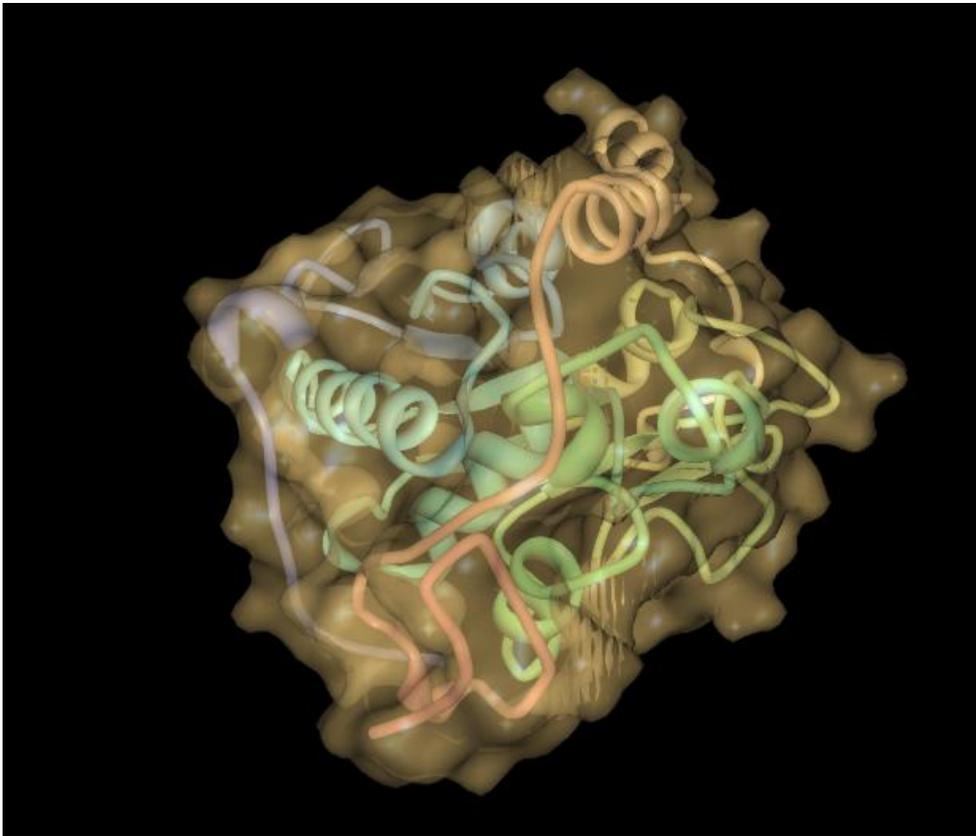


Figura 1.13. Esquema de la estructura de la CALB (www.rcsb.org).

1.5.2. MECANISMO DE REACCIÓN DE LAS LIPASAS

Debido a la similitud de la tríada catalítica que se encuentra en lipasas y proteasas, el mecanismo de la catálisis es similar en ambas e implica la formación de intermedios tetraédricos (Gandhi et al., 2000; Jaeger et al., 1999). El mecanismo transcurre a través del ataque nucleófilo del grupo hidroxilo del resto de serina (presente en el sitio activo) en el carbono del enlace éster del sustrato adecuado. Esto resulta en la formación del intermedio tetraédrico que luego perderá una molécula de alcohol para dar un intermedio acilo-enzima. Una molécula del reactivo ataca el complejo (ataque nucleofílico) para originar un intermedio tetraédrico, que finalmente, pierde una molécula de ácido para dar la enzima en su forma nativa (B. D. Ribeiro et al., 2011).

1.5.3. ESPECIFICIDAD DE LAS LIPASAS.

Las lipasas son capaces de manifestar diferentes tipos de selectividades, así pueden presentar especificidad posicional, de sustrato y enantiomérica.

- **Especificidad posicional o Regioespecificidad.**

Las lipasas se pueden dividir en tres grupos principales según su capacidad para hidrolizar glicéridos (R. Gupta, Gupta, & Rathi, 2004; Krishna & Karanth, 2002; B. D. Ribeiro et al., 2011). Así, Matori et al. han determinado el valor del índice de especificidad posicional (PSI) de muchas preparaciones microbianas de lipasas y las dividió en tres grupos; PSI valores del primer grupo fueron 100, es decir, completamente 1,3 específicas. Los del segundo grupo tenían entre 70 y 80, los del tercer grupo tenían entre -20 Y 30, es decir, relativamente no específicas. Además, estudiaron el efecto de las condiciones de reacción tales como la temperatura, pH,

1. INTRODUCCIÓN

disolvente orgánico y tensioactivos no iónicos en los valores de PSI de algunas lipasas (Matori, Asahara, & Ota, 1991).

a) *Lipasas no específicas*. Estas son las que catalizan reacciones en todos los grupos hidroxilo de los triglicéridos y por lo tanto puede liberar ácidos grasos desde cualquier posición del triglicérido. Estas lipasas catalizan la ruptura completa de triglicéridos, generando glicerol y ácidos grasos libres (**Figura 1.14**). Algunos ejemplos de lipasas no específicas se dan en la **Tabla 1.4**. (Kapoor & Gupta, 2012; Krishna & Karanth, 2002; Macrae & Hammond, 1985; B. D. Ribeiro et al., 2011; Saxena et al., 1999)

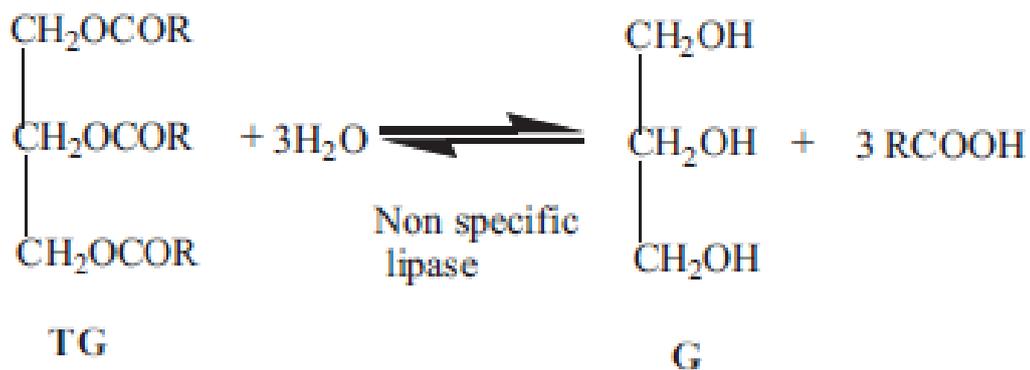


Figura 1.14. Esquema general para la reacción de hidrólisis catalizada por una lipasa no específica. TG y G representan triglicérido y glicerol, respectivamente.

1. INTRODUCCIÓN

- b) Lipasas 1,3-específicos. Éstas son los que pueden catalizar reacciones solamente sobre los grupos hidroxilo primarios de triglicéridos]. Por lo tanto, éstas preferentemente liberan ácidos grasos a partir de las posiciones 1 y 3 para originar ácidos grasos libre y di- y monoglicéridos (**Figura 1.15**). Ejemplos de lipasas 1,3-específicos se dan en la **Tabla 1.4**.
- c) Lipasas específicas de ácidos grasos. Algunas lipasas priorizan la hidrólisis de aquellos ésteres que se forman a partir de ácidos grasos de cadena larga con dobles enlaces entre C-9 y C-10, por ejemplo, lipasas de *Geotrichum candidum* y lipasas contenidas en semillas de avena sin germinar (Jensen, 1974).

En el caso de las reacciones de transesterificación efectuadas para obtener biodiésel, al no ser una reacción propiamente fisiológica convencional, parece ser que de hecho todas las lipasas se comportan como 1,3 selectivas, dificultando o imposibilitando el obtener biodiésel convencional, sin generar glicerina alguna (Bornscheuer, 1995). Por tanto, la producción de biodiésel mediante un método enzimático ha de considerar tal carácter esteroespecífico (W. Li, Du, & Liu, 2008; Tuter, Babali, Kose, Dural, & Aksoy, 1999) . Así lo avalan los resultados experimentales obtenidos hasta el momento por nuestro grupo con diversas lipasas (PPL, Lipopan 50 BG, Biolipasa R, Lipozime RM IM, CALB, N435), (Caballero et al., 2009; Calero, Verdugo, et al., 2014; C. Luna et al., 2013; C. Luna, C. Verdugo, et al., 2014a, 2014b; C. Luna, C. Verdugo, et al., 2014d; D. Luna et al., 2012; Cristobal Verdugo et al., 2011; C. Verdugo et al., 2010), tanto en forma libre como inmovilizadas por diferentes técnicas.

1. INTRODUCCIÓN

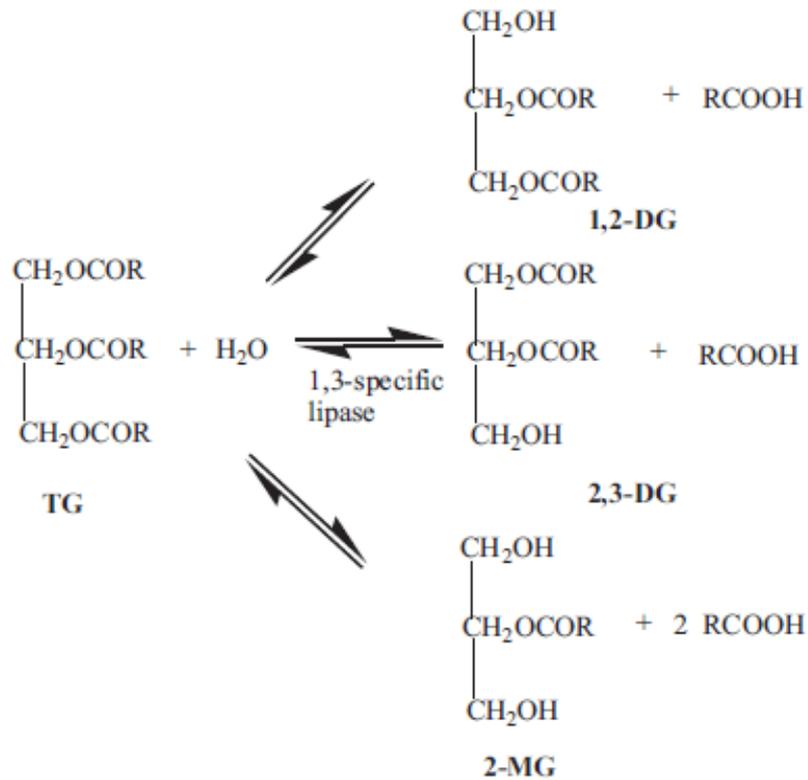


Figura 1.15. Esquema general para la reacción catalizada por una lipasa 1,3-específica. G, MG, DG y TG representan glicerol, monoglicérido, diglicérido y triglicérido respectivamente.

En efecto, tras prolongados tiempos de reacción (48 horas), nunca se consigue alcanzar el 100% de rendimiento, ni prácticamente se obtiene glicerol alguno como subproducto de la reacción. En general, la alcoholisis enzimática funciona perfectamente hasta alcanzar un 70% de rendimiento, a partir de ahí prácticamente cesa la reacción (Hernandez-Martin & Otero, 2008; Rathore & Madras, 2007). Sólo se consigue alcanzar una mezcla de FAEE+MG, en proporción 2/1, por otra parte, mezcla perfectamente viable como biocombustible y denominada Ecodiésel, el cual se puede

1. INTRODUCCIÓN

producir de forma conveniente y efectiva mediante catálisis enzimática, precisamente por su carácter 1,3-selectivo. Además, es imprescindible utilizar etanol como alcohol de cadena corta, pues el metanol parece ser que inactiva las lipasas, a pesar de que en la bibliografía aparecen artículos que relatan cómo se pretende producir biodiésel convencional con metanol y catálisis enzimática.(Gog, Roman, Tosa, Paizs, & Irimie, 2012; Salihu & Alam, 2015).

Para conseguir mejorar los niveles de conversión y/o el uso de metanol como alcohol de cadena corta, para obtener resultados similares a los obtenidos empleando catálisis básica para conseguir la reacción de transesterificación que da lugar a la mezcla de FAME, a fin de ajustarse a las actuales normas legales para el biodiésel (EN 14214). Sin embargo, a veces se han descrito buenos resultados como consecuencia de la migración de 1,2-acilo en los monoglicéridos (Camacho et al., 2006; W. Du, Xu, Liu, & Li, 2005; Oda et al., 2005).

La Acil migración es el proceso no enzimático que implica un movimiento de un grupo acilo de un grupo hidroxilo hasta uno adyacente (Fureby, Adlercreutz, & Mattiasson, 1996; Yang, Fruekilde, & Xu, 2005). Durante la reacción de hidrólisis 1,3-específica de triglicéridos catalizada por lipasa, se producen 2-monoglicérido y 1,2 o 2,3-diglicéridos. Estos sufren la migración de acilo lentamente para producir 1,3-diglicéridos y 1-monoglicéridos que a su vez son hidrolizados por lipasas 1,3-específicas para originar ácidos grasos libres y glicerol (**Figura 1.16**) (Kapoor & Gupta, 2012). Por lo tanto, con tiempos de reacción prolongados se puede eventualmente lograr la hidrólisis completa de triglicéridos hasta ácidos grasos libres y glicerol (Jensen, Dejong, & Clark, 1983). Holmberg y Oterberg (Holmberg & Osterberg, 1988) han obtenido el 80% de 2-monoglicérido por hidrólisis de triglicéridos usando una lipasa 1,3-específica e informó que rendimientos más altos no fueron posibles debido al fenómeno de la acil migración, que provocó la hidrólisis completa hasta glicerol y ácidos grasos.

1. INTRODUCCIÓN

Rendimientos en la producción de Biodiésel de más del 90% han sido obtenidos utilizando lipasas 1,3-específicas (el rendimiento teórico de biodiésel utilizando una lipasa 1,3-específica debería ser sólo el 66%) y esto se ha atribuido al fenómeno de la acil migración (Wei Li, Du, Li, Sun, & Liu, 2010; Szczesna-Antczak, Kubiak, Antczak, & Bielecki, 2009; Y. Wang et al., 2008).

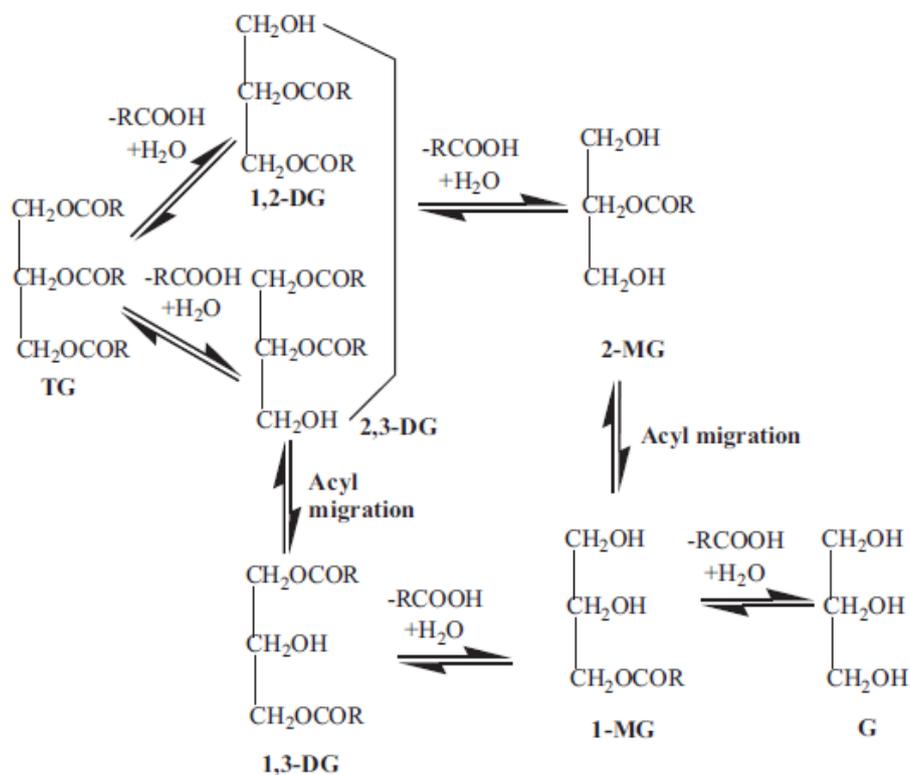


Figura 1.16. Productos obtenidos, incluidos los derivados de la migración de acilo, en el caso de una hidrólisis catalizada por una lipasa 1,3-específica que cataliza la hidrólisis de triglicéridos. G, G, DG y TG representan glicerol, monoglicérido, diglicérido y triglicérido respectivamente.

1. INTRODUCCIÓN

Los factores que tienen un efecto sobre la acil migración son:

- *La adición de ácidos, bases o intercambiadores de iones al medio de reacción.* El material empleado como soporte de la enzima también puede afectar a la migración de acilo si tiene una superficie ácida o básica, tal como sílice, celita, y resinas de intercambio iónico (Fureby, Adlercreutz, et al., 1996). Por ejemplo, Du et al. (W. Du et al., 2005) publicó que se podría lograr más del 90% de rendimiento en la producción biodiésel en la transesterificación de aceite de soja catalizada por la lipasa *Thermomyces lanuginosus* (TLL), una lipasa 1,3-específica, mediante la adición de gel de sílice al medio de reacción. Wang et al. (Y. Wang et al., 2008) han publicado que la adición de trietilamina (una base orgánica débil) da lugar a un mayor rendimiento en la producción de biodiésel convencional mediante transesterificación de aceite de maíz, catalizada con TLL (*Thermomices lanoginosus*).
- *La polaridad del disolvente.* Sjursnes y Anthonsen (Sjursnes & Anthonsen, 1994) han publicado que los 1,2-diglicéridos isomerizan más rápidamente en disolventes apolares que en disolventes polares. Fureby et al. (Fureby, Virto, Adlercreutz, & Mattiasson, 1996) publicó de que la monooleína se mantuvo estable en disolventes hidrofóbicos dipolares (por ejemplo, ciclohexanona), mientras que en disolventes hidrofóbicos apróticos (por ejemplo, hexano) y disolventes hidrófilos próticos (por ejemplo, etanol, metanol) se ve favorecida la acil migración. Li et al. (Wei Li, Du, Li, Li, & Liu, 2010) han estudiado la influencia del disolvente sobre la cinética de la migración de acilo, tanto de 1,2-diglicéridos como de 2-monoglicéridos, de forma que la disminución de la polaridad del disolvente eleva las constantes de velocidad de la acil migración, en general.

1. INTRODUCCIÓN

- *La actividad de agua.* La Tasa de migración de acilo disminuye con el aumento en la actividad (o concentración) de agua en el medio de reacción. Por ejemplo, Sjursnes y Anthonsen (Sjursnes & Anthonsen, 1994) han obtenido que la tasa de migración de acilo de 1,2-dibutirina disminuye con el aumento de la actividad (o concentración) de agua en hexano. Fureby et al. (Fureby, Virto, et al., 1996) han publicado que la tasa de migración de acilo de monooleínas disminuye cuando se utilizan disolventes saturados con agua, en vez de disolventes secos. En este sentido, Li et al. (Wei Li, Du, Li, Sun, et al., 2010) han descrito que la actividad de agua es el factor crucial con influencia en la cinética de la migración de acilo y que la tasa de migración del acilo disminuiría con el aumento de la actividad de agua.
- *La temperatura de reacción.* La tasa de migración de acilo se eleva con el aumento de la temperatura independientemente del disolvente usado.
- *Ph de la reacción.* En este sentido, Hernández et al. (Hernandez, Garcia-Verdugo, Porcar, & Fernandez-Lafuente, 2011) han descrito que, en la hidrólisis de triacetina usando lipasa B de *C. antarctica* (CALB) y lipasa de *R. miehei* inmovilizadas a pH 7,0, se produce la migración de acilo en forma espontánea, dando lugar a una mezcla de 1,2 y 1,3 diacetinas, mientras que a pH 5,5 la migración de acilo se reduce y sólo se produce la 1,2 diacetina.

- **Especificidad de los sustratos:**

Las lipasas muestran especificidad no sólo con respecto a los ácidos grasos (tipo y longitud de la cadena) sino también con respecto a los alcoholes empleados como sustratos en la reacción de transesterificación (Jensen et al., 1983). Así, se ha evaluado la selectividad según diferentes ácidos grasos de varias lipasas disponibles

1. INTRODUCCIÓN

comercialmente (Jachmanian, Schulte, & Mukherjee, 1996; Mukherjee, Kiewitt, & Hills, 1993; Rangheard, Langrand, Triantaphylides, & Baratti, 1989). La especificidad de sustratos de diversas lipasas está bien documentada en la literatura (Roberto Fernandez-Lafuente, 2010; Guncheva & Zhiryakova, 2011).

Algunas lipasas tienen preferencia por ciertos ácidos grasos o grupos de ácidos grasos. Por ejemplo, lipasa de *Aspergillus flavus* muestra una mayor preferencia por la tricaprina (triglicérido correspondiente al ácido caproico o octanoico) que por la trioleína, (triglicérido correspondiente al ácido oleico, o ácido *cis*-9-octadecenoico) (Long, Ghazali, Ariff, Man, & Bucke, 1998). Las lipasas de *C. rugosa* y *R. miehei* tienen una mayor preferencia por el ácido oleico) que por el ácido eláidico (ácido *trans*-9-octadecenoico), mientras que la lipasa A de *C. antarctica* prefiere el ácido oleico sobre el ácido eláidico (Borgdorf & Warwel, 1999). Algunas lipasas discriminan ciertos ácidos grasos o grupos de ácidos grasos. La lipasa pancreática porcina (PPL) discrimina entre restos 2-*cis* octadecanoil, de fracciones con restos 7-*cis* octadecanoil (Heimerma.Wh, Gordon, Kowalysh.De, Jensen, & Holman, 1973). La lipasa de las semillas de avena discrimina tripetroselinina (triglicérido correspondiente al ácido petroselinico, un ácido graso monoinsaturado omega-12) respecto a la trioleína, linoleina y tri- α -linoleina (Piazza, Bilyk, Brower, & Haas, 1992). En lo que respecta al mecanismo de la esterificación, Jachmanian et al. (Jachmanian et al., 1996) determinaron las constantes de especificidad de las lipasas de diferentes fuentes, en la esterificación de ácidos grasos con n-butanol y encontraron que lipasas de *C. rugosa*, *R. miehei*, *Rhizomucor arrhizus*, *Penicillium cyclopium*, *Penicillium* sp. (Lipasa G) discrimina fuertemente ácidos grasos insaturados con el primer doble enlace desde el extremo carboxilo en un número par de carbono, es decir, *cis*-4, *cis*-6 y *cis*-8.

Las lipasas también exhiben especificidad de longitud de cadena del ácido graso. La mayoría de las lipasas prefieren ésteres de ácidos grasos saturados de cadena

1. INTRODUCCIÓN

media (C4) que de larga (C16), pero hay algunas excepciones. Lipasas de *Penicillium roquefortii* (mejorador del sabor en el queso) pueden hidrolizar los ésteres de cadena corta, pero no de los ácidos grasos de cadena media y larga, mientras que una lipasa de *R. miehei* puede hidrolizar eficientemente ésteres de ácidos grasos, tan largas como de C22 (Krishna & Karanth, 2002). Las lipasas del páncreas porcino (PPL) y *C. rugosa* tienen preferencia por ácidos grasos cortos (Berger & Schneider, 1991).

Dalal et al. (Dalal, Singh, Raghava, Rawat, & Gupta, 2008) determinaron la especificidad de una lipasa de *Burkholderia cepacia* cepa ATCC 25609 hacia diversos aceites y descubrieron que de los siete aceites diferentes seleccionados, tenía más elevada la actividad al actuar sobre el aceite de jatropha.

En lo que respecta al efecto de los alcoholes, las actividades de las lipasas con diferentes tipos de alcoholes siguen el orden: alcoholes primarios > secundarios > terciarios. Los t-alcoholes, (alcoholes terciarios) y sus ésteres son sustratos pobres para las lipasas. No obstante, Yeo et al. (Yeo, Nihira, & Yamada, 1998) han descrito una nueva lipasa de *Burkholderia* sp. YY62 que hidroliza los ésteres de t-butilo con eficacia y que tenía mayor preferencia por el octanoato de t-butilo en comparación con palmitato (o hexadecanoato) y estearato (u octadecanoato) de t-butilo. Otras lipasas por ejemplo, la lipasa pancreática porcina (PPL), la lipasa de *C. rugosa*, la lipasa A de *C. antarctica* han mostrado cierta actividad limitada hacia tales sustratos. Lee y Parkin (Lee & Parkin, 2000) estudiaron la especificidad de ácidos grasos de cadena corta, mediana y larga en esterificaciones multicompetitiva con glicerol, 1,2-propanodiol o 1,3-propanodiol usando lipasa *P. cepacia*, *R. miehei*, o lipasa B de *C. antarctica* como biocatalizadores y encontraron que con lipasa de *P. cepacia*, cada alcohol como sustrato (con la excepción de glicerol) muestran reactividad máxima con ácidos grasos con una longitud de cadena de C8 y C16, mientras que tanto la lipasa de *R. miehei*, o

1. INTRODUCCIÓN

lipasa B de *C. antarctica*, muestran reactividad máxima en una longitud de cadena de ácido graso de C8.

Las lipasas no sólo pueden catalizar triglicéridos y ésteres alifáticos, sino también una gran variedad de otros compuestos como ésteres alicíclicos, bicíclicos, y aromáticos, e incluso ésteres basados en compuestos organometálicos. Las lipasas también pueden aceptar tioésteres y aminas activadas. Así, la lipasa de *R. miehei* acepta una amplia gama de alcoholes que contienen una variedad de otros grupos funcionales, por ejemplo, ciclohexilmetanol, etoxipropanodiol. En este sentido, se han descrito en la literatura una serie de reacciones catalizadas por lipasas utilizando sustratos no naturales (Chandrasekaran & Wangikar, 2003; Ghanem, 2007; R. D. Schmid & Verger, 1998; Sergeeva, Mozhaev, Rich, & Khmelnsky, 2000). La lipasa A de *C. antarctica* (CALA) y lipasas de *R. miehei* hidrolizan los triglicéridos con alcoholes más grandes y complejos, mientras que la lipasa B de *C. antarctica* (CALB) prefiere ácidos grasos más largos (como parte de las estructuras de triglicéridos). Ácidos grasos grandes que contienen cadenas laterales aromáticas se hidrolizan solamente por las enzimas CALB (S. Naik et al., 2010).

Este tipo de especificidad de sustrato tan variada que se encuentra en las lipasas, podría explicarse por las diferencias en la estructura física del sitio de unión del ácido graso. Así, Pleiss y colaboradores (Pleiss et al., 1998) han determinado que un sitio de unión tipo "túnel" acepta sustratos con ácidos grasos de cadena larga en comparación con sustratos voluminosos, mientras que las lipasas con sitio de unión en forma de "grieta" o "embudo" muestran el comportamiento opuesto.

1. INTRODUCCIÓN

▪ Estereoespecificidad.

La estereoespecificidad se define como la capacidad de las lipasas para distinguir entre las posiciones sn-1 y sn-3 en el triglicérido. Las lipasas pueden mostrar una estereoselectividad insignificante o ser muy estereoselectiva. La estereoselectividad de la misma enzima puede variar de acuerdo a la estructura del sustrato. La lipasa pancreática, la lipasa de *Rhizopus arrhizus* y la lipasa de *Pseudomonas fluorescens* no tienen estereoespecificidad vis-a-vis ninguna con las posiciones principales de triacilglicerol o alquildiacilglicerol. Una lipasa gástrica de mamíferos (humanos) exhibe selectividad limitada para la posición sn-3 de triglicéridos sintéticos (Carriere et al., 1997). Lipasas de *Pseudomonas* sp. y *P. aeruginosa* exhibieron preferencia sn-1 con trioctanoína triglicérido correspondiente al ácido caproico o octanoico) como sustrato, mientras que la lipasa B de *C. antarctica* muestra preferencia sn-3, con alta estereoespecificidad. Todas las demás lipasas microbianas muestran una estereoespecificidad baja o media sn-1 (3) hacia trioctanoína (lipasas de *Rhizopus oryzae*, *R. miehei* y *C. rugosa* hidrolizan trioctanoína preferentemente a sn-1 con baja estereoselectividad). Rogalska et al. (Rogalska, Cudrey, Ferrato, & Verger, 1993) (Rogalska et al., 1993) publicaron que se produce un cambio en la estereoselectividad de las lipasas (de *G. candidum* M, *G. candidum* A, y *C. antarctica* B) con diferentes sustratos. Por ejemplo, la estereoselectividad para la posición sn-3 en la trioctanoína cambia a posición sn-1 para trioleína.

1.5.4. VERSATILIDAD CATALÍTICA DE LAS LIPASAS

Las lipasas son la clase de enzimas más ampliamente utilizadas en biotecnología (B. D. Ribeiro et al., 2011; A. Schmid et al., 2002). Esto incluye sus aplicaciones en síntesis orgánica y resolución cinética de compuestos racémicos (Ghanem, 2007; Hasan, Shah, & Hameed, 2006). Hay tres razones principales que justifican este hecho:

- a) La principal razón, que a menudo se pasa por alto, es que una gran variedad de lipasas se encontraban ya disponibles para sus aplicación biotecnológica desde los principios de la enzimología industrial. La principal aplicación temprana fue en el tratamiento de la grasa. Por lo tanto, cuando otras áreas, como la catálisis enzimática, se aplicó en medios de reacción poco hidrófilos, las lipasas se convirtieron en la opción más conveniente.
- b) Las lipasas son algo más que una única clase de enzimas que lleva a cabo una serie de reacciones, a menudo en medios heterogéneos. Así, un elevado número de lipasas muestran el fenómeno de la "activación interfacial". Este fenómeno distingue las lipasas de las esterasas. "Para soportar el efecto de desnaturalización de la interfaz, las lipasas han desarrollado estructuras inusualmente estables, que pueden sobrevivir incluso al efecto de disolventes orgánicos" (A. Schmid et al., 2002).
- c) Las lipasas tienen especificidades de sustrato amplios. Hidrolizan tanto ésteres de ácidos grasos como alcoholes de varias longitudes de cadena. Del mismo modo, también hidrolizan triglicéridos formados a partir de ácidos grasos de cadena larga de diversa longitudes de cadena. Aparte de hidrólisis, las lipasas también pueden catalizar la esterificación, transesterificación e interesterificación, en medios de reacción poco hidrófilos.

1. INTRODUCCIÓN

Lo que ha hecho de las lipasas ser aún más versátiles es el rápido desarrollo de la denominada versatilidad catalítica (M. N. Gupta, Kapoor, Majumder, & Singh, 2011; Hult & Berglund, 2007). Este factor es el que promete ser el principal motor para seguir trabajando en esta área.

Versatilidad o "promiscuidad" enzimática es la capacidad de las enzimas para catalizar reacciones diferentes de su reacción fisiológica natural, como es el caso en las reacciones de transesterificación o alcoholisis enzimática de triglicéridos catalizadas por lipasas. Este comportamiento no se da sólo entre unas pocas enzimas, al contrario es más bien generalizado. Así, O'Brien y Herschlag (O'Brien & Herschlag, 1999) sostienen que se trata de una característica ventajosa para la obtención de nuevos biocatalizadores. Los procesos asociados de interés biotecnológico se consideran generalmente menos eficientes que las funciones biológicas características de una enzima (Babtie, Tokuriki, & Hollfelder, 2010). Sin embargo, se han publicado tasas de velocidad comparables a las mostradas por las enzimas que catalizan las reacciones propias de las mismas.

Hult y Berglund (Hult & Berglund, 2007) clasifican la versatilidad enzimática en tres clases principales:

- a) **Condiciones de Reacción:** Es la capacidad de la enzima para catalizar reacciones bajo condiciones no naturales como medios anhidros, temperatura o pH extremos.
- b) **Sustrato enzimático:** Cuando las enzimas pueden usar sustratos diferentes para llevar a cabo una reacción química similar.
- c) **Mecanismo catalítico:** Es la capacidad del sitio activo de la enzima para catalizar transformaciones químicamente distintas. Estas transformaciones

1. INTRODUCCIÓN

químicas pueden diferir en el tipo de enlaces generados/rotos y/o en el mecanismo catalítico de formar/romper enlaces. Hult y Berglund (Hult & Berglund, 2007) han dividido aún más esta característica de la enzima en dos tipos: accidental (reacción catalizada por una enzima de tipo silvestre) e inducida (nueva actividad enzimática inducida por mutaciones) de la "promiscuidad" enzimática catalítica.

La versatilidad enzimática de los sustratos y en condiciones de reacción son conocidas desde hace tiempo. La versatilidad enzimática en los mecanismos catalíticos es la que recientemente está ganando recientemente más atención (Babtie et al., 2010; Hult & Berglund, 2007; Khersonsky & Tawfik, 2010). Este aspecto, se centra fundamentalmente en las características del sitio activo que pueden generar nuevos enlaces Babtie et al. (Babtie et al., 2010) y Khersonsky y Tawfik (Khersonsky & Tawfik, 2010).

Así, en este tipo de versatilidad pueden influir una serie de aspectos como:

- **Unión al Sustrato:** La diversidad y la flexibilidad conformacional se sabe que desempeña un papel importante en la catálisis de muchas enzimas para mostrar versatilidad. "En particular, la movilidad de los bucles del sitio activo parece jugar un papel clave en la mediación de la promiscuidad " (Khersonsky & Tawfik, 2010).
- **Uniones hidrofóbicas:** La unión entre un sustrato y una enzima se da a través de enlaces de hidrógeno, interacciones electrostáticas y enlaces hidrófobos. Las primeras dos dependen de la complementariedad de las estructuras del sustrato y los residuos del sitio activo. Los enlaces hidrófobos dependen de la desolvatación y dependientes de la entropía del sistema, son mucho menos dependientes de las estructuras específicas. Por lo tanto, la eficiencia catalítica de muchas

1. INTRODUCCIÓN

"reacciones versátiles" van a depender de la hidrofobicidad del sustrato (Babtie et al., 2010).

- **Potencial reactivo de los sitios activos:** El estado de protonación de un mismo residuo catalítico para la función nativa puede ser diferente de la de la función alternativa o "versátil" (Khersonsky & Tawfik, 2010).

- **Influencia de los cofactores:** La incorporación o intercambio de cofactores pueden conducir al cambio en la especificidad de la enzima y por lo tanto conseguir que tales enzimas sean más versátiles (Babtie et al., 2010; Khersonsky & Tawfik, 2010).

1.5.4.1. Condiciones de Reacción.

Las lipasas exhiben alta estabilidad en disolventes orgánicos, en dichas condiciones se pueden llevar a cabo la reacción inversa de la hidrólisis, es decir, la síntesis de derivados de los ácidos grasos y pueden catalizar así varias reacciones como esterificación o los diversos tipos de transesterificación: acidolisis, alcoholisis, aminolisis o interesterificación (Ghanem, 2007; Hasan et al., 2006; Rodrigues & Fernandez-Lafuente, 2010).

Así mismo, se encuentran descritas en la bibliografía condiciones experimentales muy variadas en las que se han utilizado lipasas en procesos químicos versátiles. A elevadas temperaturas (enzimas de microorganismos termófilos) (Soliman, Knoll, Abdel-Fattah, Schmid, & Lange, 2007), pH extremos (enzimas de microorganismos acidófilos y alcalófilos) (Bradoo, Saxena, & Gupta, 1999), concentraciones elevadas de sal (enzimas de microorganismos halófilos), en fase gaseosa (Capewell, Wendel, Bornscheuer, Meyer, & Scheper, 1996), condiciones libres de solventes (Nunes, Pires-Cabral, & Ferreira-Dias, 2011), en líquidos iónicos (K.-P.

1. INTRODUCCIÓN

Zhang, Lai, Huang, & Yang, 2011), en fase sólida (Ulijn & Halling, 2004). Las ventajas e inconvenientes de los diversos medios de reacción que se han utilizado para efectuar las reacciones catalizadas por lipasas se han discutido ampliamente en la literatura. Medios bifásicos que consisten en disolventes inmiscibles con agua y tampones acuosos son de especial relevancia para las lipasas, ya que la mayoría de estas enzimas sufren de activación interfacial (Brink, Tramper, Luyben, & Vantriet, 1988).

Tweddell et al. (Tweddell, Kermasha, Combes, & Marty, 1998) estudiaron las actividades de esterificación e interesterificación de la lipasa de *Rhizopus nivea* y la lipasa de *Mucor miehei* en tres tipos diferentes de medios orgánicos y sistemas bifásicos, obteniendo mejores resultados con las reacciones de esterificación, en comparación con las reacciones de interesterificación.

Así, se ha encontrado que los disolventes orgánicos influyen en la selectividad de reacciones catalizadas por lipasas. En este sentido se ha descrito que los disolventes pueden afectar la regioselectividad de la lipasa. Rubio y Klivanov (Rubio, Fernandezmayorales, & Klivanov, 1991) obtuvieron que la transesterificación de 1,4 dibutililoxi-2-octilbenceno con butanol catalizada por la lipasa *P. cepacia*, en diferentes disolventes orgánicos, de forma que los disolventes hidrofóbicos favorecen la formación del ácido 4-fenol-butiriloxi-2-octil mientras que los disolventes hidrófilos favorecieron la formación del fenol 4-butiriloxi-3-octilo.

Los disolventes también pueden afectar la selectividad proquiral de las lipasas (que se puede definir como la relación de la tasa de acumulación del enantiómero principal sobre el alternativo de menor concentración). Así, Terradas et al. (Terradas, Testonhenry, Fitzpatrick, & Klivanov, 1993) obtuvieron que en la hidrólisis catalizada por la lipasa *Pseudomonas*, del diéster proquiral 2-(amino 1naftoil)trimetilen dibutirato a su monoéster, en diversos disolventes hidratados, la selectividad pro-S de

1. INTRODUCCIÓN

la enzima se vio afectada por el disolvente en un intervalo comprendido entre 3 y 30. Los disolventes también pueden dar lugar a la inversión de la enantioselectividad. La hidrólisis de varios derivados proquirales de 1,4 dihidropiridina catalizadas por lipasa AH (*Pseudomonas* sp.), en un disolvente orgánico originó los enantiómeros (S) (ee 90%) en iso-propil éter y el enantiómero (R) (ee 90%) en ciclohexano (Hirose et al., 1992).

En conclusión, se puede afirmar que las lipasas aceptan una amplia gama de ácidos y ésteres, y catalizan esterificación, transesterificación y resolución cinética de enantiómero en medios anhidros, poniendo de manifiesto su versatilidad, tanto respecto a sustratos como con las condiciones de reacción. Ambos tipos de versatilidades de las lipasas han sido intensamente investigadas durante las últimas décadas resultando de esto diversas aplicaciones industriales (Hult & Berglund, 2007; A. Schmid et al., 2001).

1.5.4.2. Mecanismo Catalítico.

La versatilidad conseguida actuando sobre el mecanismo catalítico de la lipasa es de gran actualidad y sólo recientemente ha sido explotado para conseguir aplicaciones sintéticas (Hult & Berglund, 2007). En este sentido se han descrito gran cantidad de reacciones regio y enantioselectivas catalizadas por lipasas (Busto, Gotor-Fernandez, & Gotor, 2010; Wu, Liu, & Lin, 2010). Estas reacciones versátiles incluyen formaciones de enlace carbono-carbono, carbono-heteroátomo, formaciones de enlace heteroátomo-heteroátomo y procesos oxidativos (Busto et al., 2010). En la **Tabla 1.5** se recogen algunos ejemplos representativos de los procesos indicados.

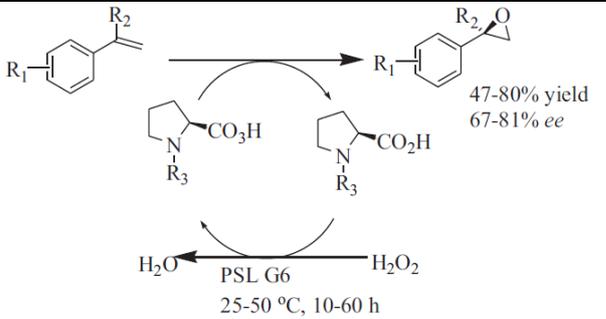
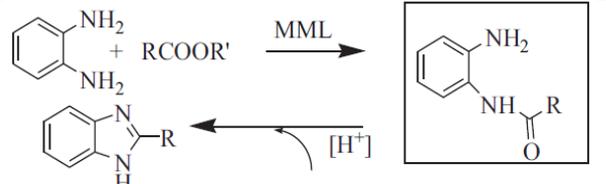
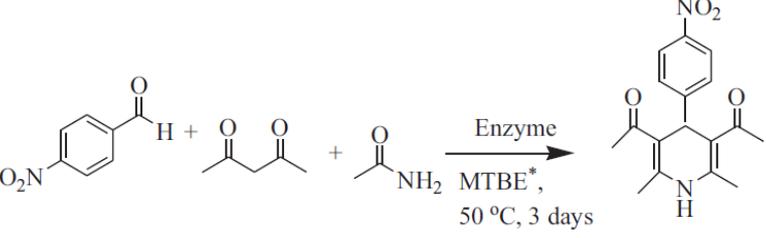
1. INTRODUCCIÓN

Tabla 1.5. Reacciones tipo que muestran la versatilidad catalítica de las lipasas

Nº	Reacciones catalizadas por lipasa	Referencia
1	<p> $\text{R} = p\text{-NO}_2, o\text{-NO}_2, m\text{-NO}_2, p\text{-CN}$ </p>	(Branneby et al., 2003)
2	<p> 96% yield, 4h without CALB= 95% yield, 4 days </p>	(Majumder, Ramesh, & Gupta, 2009)(Majumder et al., 2009)
3	<p> $\text{R}_1 = \text{Me, OMe}; \text{R}_2 = \text{H, Me, OMe}$ </p>	(C. Li, Feng, Wang, Zhou, & Yu, 2008)
4	<p> $\text{R} = p\text{-NO}_2, m\text{-NO}_2, \text{H}, p\text{-OMe}, p\text{-CN}, p\text{-Cl}$ </p> <p>(44-87% yield)</p>	(M. Svedendahl, Hult, & Berglund, 2005)
5	<p> R_1, R_2 </p>	(K. Li et al., 2009)
6	<p> $\text{R}_1 = \text{Alkyl}$ $\text{R}_2, \text{R}_3, \text{R}_4 = \text{H, Alkyl}$ </p> <p> $\text{R}_5 = \text{Alkyl}$ </p> <p>Lipase, Hexane, rt, 4h</p> <p>2-99% yield</p>	(Torre et al., 2004)

1. INTRODUCCIÓN

Tabla 1.5. (Cont.)

Nº	Reacciones catalizadas por lipasa	Referencia
7	 <p style="text-align: center;">PSL G6 25-50 °C, 10-60 h</p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin: 0 auto;"> <p>R₁=H, <i>p</i>-Cl, <i>m</i>-Cl, <i>o</i>-Cl, <i>p</i>-Br, <i>m</i>-Br, <i>p</i>-NO₂, <i>m</i>-NO₂, <i>o</i>-NO₂, <i>p</i>-Me R₂=H, Me R₃= 3,4-(NO₂)₂C₆H₃, Bn</p> </div>	(Bjorkling, Godfredsen, & Kirk, 1990)
8	 <p style="text-align: center;">MML/RCOOR'</p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin: 0 auto;"> <p>R = (CH₂)_nCH₃ n=4,6,8,10,12,14,16 R' = methyl, ethyl</p> </div>	(Maria Svedendahl et al., 2008)
9	 <p style="text-align: center;">Enzyme MTBE*, 50 °C, 3 days</p>	(L. Wang et al., 2010)

* MTBE metil terc-butil éter

1.5.5. APLICACIONES DE LAS LIPASAS.

Las lipasas pueden llevar a cabo no sólo reacciones hidrolíticas, sino también reacciones sintéticas como esterificación, acidólisis, alcoholólisis etc, como se indica en la **Tabla 1.5** Que se pueden llevar a cabo tanto en medios acuosos u orgánicos, tienen amplia especificidad de sustrato, y pueden catalizar una gran variedad de biotransformaciones quimio-, regio- y enantioselectivas (Ghanem, 2007; Hasan et al., 2006; Rodrigues & Fernandez-Lafuente, 2010). Esta versatilidad de lipasas las hace las enzimas de elección para su aplicación en las industrias de alimentos, detergentes, farmacéuticos, de cuero, textiles, cosméticos y papelera (Contesini, Lopes, Macedo, Nascimento, & Carvalho, 2010; Guncheva & Zhiryakova, 2011; Houde, Kademi, & Leblanc, 2004). Una de las razones más importantes para el gran número de aplicaciones de las lipasas es que exhiben regioespecificidad, especificidad de sustrato y estereoespecificidad. Además, algunas lipasas exhiben 1,3 regioespecificidad y pueden ser utilizados para interesterificar triglicéridos naturales de una manera regioselectiva.

Por ejemplo, equivalentes de manteca de cacao [triglicéridos predominantes de la manteca de cacao son glicerinas con ácido oleico (O) en la posición sn-2 y esteárico (S) y palmítico (P) ácidos en la posición sn-1 y sn-3 posiciones (es decir, SOS y SOP)] se han producido a través de interesterificación catalizada por lipasa de triglicéridos naturales adecuados, tales como fracción media de aceite de palma (que contiene un resto de ácido palmítico en las posiciones 1 y 3 y ácido oleico en la posición 2, POP) o aceite de girasol (que tiene un alto contenido de ácido oleico, OOO) con ácido esteárico o triestearina (SSS).

Las lipasas discriminan entre los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) omega 3 tales como el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA) y, por

1. INTRODUCCIÓN

tanto, hidrólisis catalizadas por lipasas se han utilizado para la producción de ácidos grasos PUFA concentrados en omega 3. Así, Kahveci y Xu (Kahveci & Xu, 2011) llevaron a cabo el enriquecimiento en omega 3 de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) en la fracción glicérido del aceite de salmón por hidrólisis catalizada con lipasa de *C. rugosa* (CRL). La **Tabla 1.6** muestra algunas de las aplicaciones de lipasas en los sectores industriales (Kapoor & Gupta, 2012).

1.5.6. PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LIPASAS.

Las lipasas producidas comercialmente son en su mayoría de origen microbiano. Los métodos más ampliamente usados para la producción de lipasas comerciales son el cultivo sumergido y la fermentación en estado sólido. Microorganismos productores de lipasas tales como bacterias, hongos y levaduras son aislados y seleccionados por su actividad lipolítica (R. Gupta et al., 2004; N. Li & Zong, 2010). La producción de lipasa depende de varios factores, tales como fuente de carbono y nitrógeno, pH, temperatura, oxígeno disuelto, la agitación y de iones metálicos (R. Gupta et al., 2004; Sharma, Chisti, & Banerjee, 2001). La producción de lipasas también puede ser inducida al proporcionar lípidos como fuente de carbono (Tributirina).

1. INTRODUCCIÓN

Tabla 1.6. Aplicaciones industriales de lipasas.

Reacción Lipásica	Industria	Producto/ aplicación	Referencias
Hidrólisis de las grasas	Detergente	Eliminación de manchas de aceite de tejidos	(Hasan et al., 2006)
Hidrólisis de la grasa de la leche, la maduración del queso,	Láctea	Desarrollo de aromatizantes en la leche, el queso y la mantequilla	(Hasan et al., 2006)
Hidrólisis	Panadería, Cervecería y alimentaria	Mejora de sabor y calidad en bebidas, carne, productos de pescado	(Janssens, Depooter, Schamp, & Vandamme, 1992)
Hidrólisis	Peletería (cuero)	Productos de cuero	(Hasan et al., 2006)
Hidrólisis	Papelera	Papel con una mejor calidad	(Hasan et al., 2006)
Transesterificación de Aceites / grasas	Aceites naturales	Manteca de cacao	(Bloomer, Adlercreutz, & Mattiasson, 1990)
Esterificación y transesterificación	Sabor y aroma	Síntesis de ésteres de sabor naturales	(Krishna, Manohar, Divakar, Prapulla, & Karanth, 2000)
Glicerólisis de grasas / aceites	Surfactantes	Monoglycerides for surfactants	(A. Schmid et al., 2002)
Resolución de racémicos alcoholes / ésteres	Medicamentos y productos farmacéuticos	"Building blocks" para fármacos quirales	(Hasan et al., 2006)
La acilación de alcoholes de azúcar	Surfactantes	Ésteres monoacil azúcar para tensioactivos	(Chopineau, McCafferty, Therisod, & Klibanov, 1988)

Varios investigadores han evaluado diferentes aceites como fuentes de carbono en el medio de cultivo para aumentar la producción de lipasa. En este sentido, Kumar et al. (Kumar, Kikon, Upadhyay, Kanwar, & Gupta, 2005) encontró que el aceite de mostaza (1% v / v) fue el mejor inductor de la producción de lipasa de *Bacillus*

1. INTRODUCCIÓN

coagulans BTS-3, en comparación con Tween 80, Tween 20 y aceite de oliva. En su estudio, la actividad óptima de la lipasa fue 1.16 U/ ml, del cultivo operando en las condiciones de, temperatura 55 °C y pH 8,5 en 48h de tiempo de cultivo, empleando aceite de mostaza como fuente de carbono, peptona y extracto de levadura (1:1), como fuente de nitrógeno. La purificación de la lipasa es necesaria para su uso comercial en diversas industrias. Las estrategias de purificación incluyen la concentración del medio de cultivo por ultrafiltración o precipitación con sulfato amónico, seguido de purificación adicional, el uso de técnicas sofisticadas tales como cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico y filtración en gel (R. Gupta et al., 2004).

Varias técnicas novedosas como procesos de membrana, inmunopurificación, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía en columna, etc. se aplican para la purificación de lipasas (Saxena, Sheoran, Giri, & Davidson, 2003). Las propuestas de esquemas para producción y purificación de lipasa a gran escala deben ser de alto rendimiento, rápidos y lo menos costosos posibles.

1.5.7. PREPARACIONES DE BIOCATALIZADORES.

Las enzimas muestran una baja actividad catalítica en medios no acuosos. Para explicar esta disminución de la actividad enzimática de las lipasas en medios no acuosos se han descrito en la literatura (Roy & Gupta, 2004). En este sentido, diferentes técnicas han sido utilizadas para mejorar el rendimiento de las enzimas en disolventes no acuosos, tales como: impresión, la inmovilización o modificación química (Sheldon & van Pelt, 2013). En algunos casos estos enfoques han originado como resultado cambios en la especificidad de las lipasas. Así, se han investigado los efectos de las técnicas de inmovilización en la regioselectividad y la enantioselectividad

1. INTRODUCCIÓN

de lipasas y en la mejora de la selectividad de la enzima a través de inmovilización controlada (Jose M. Palomo, 2009). En este sentido, cuando la lipasa de *P. cepacia* se inmovilizó sobre polipropileno, mostró reversión completa de la especificidad de sustrato (Pencreach, Leullier, & Baratti, 1997).

Las enzimas libres manifiestan mayor actividad con ácidos grasos de cadena larga (C14-C18), mientras que las enzimas inmovilizadas prefieren los de cadena corta (C2-C6). Estos efectos podrían ser el resultado de la purificación parcial de la lipasa original durante la inmovilización y las limitaciones difusionales (o de transferencia de masa) propias de las enzimas inmovilizadas (Pencreach et al., 1997).

Palomo et al. (Jose M. Palomo, Filice, Fernandez-Lafuente, Terreni, & Guisan, 2007) obtuvieron que la hidrólisis de per-O-acetilado β -Galactosa efectuada por la lipasa *Thermomyces lanuginosa* (TLL), soportada por diferentes métodos de inmovilización y se produjo específicamente el producto mono-desacetilado en posición anomérica (C1), cuando las lipasas TLL estaban inmovilizadas sobre Sefarosa activada con CNBr mientras que la TLL inmovilizada sobre octilagarosa generó el producto mono-desacetilado en la posición C6. Por otra parte, Kamiya y Goto (Kamiya & Goto, 1998) obtuvieron una variación en la selectividad de la lipasa de *Candida cylindracea* por técnica de "imprinting". La selectividad de la lipasa hacia el isómero (R) se cambió a una preferencia por el isómero (S) como resultado de haber sido recubierto con moléculas de surfactante.

Se han encontrado diferentes formulaciones de biocatalizadores, que implican la precipitación de enzimas para su uso en medios no acuosos, que originan una mayor actividad en los medios no acuosos, si los comparamos con polvos liofilizados (Sheldon, 2011). Recientemente, se han descrito en el caso de las lipasas algunas de estas formulaciones de biocatalizadores y sus aplicaciones (Majumder & Gupta, 2011)

1. INTRODUCCIÓN

(Majumder & Gupta, 2010; Majumder, Mondal, Singh, & Gupta, 2008; Solanki & Gupta, 2011). Así, la lipasa de *P. cepacia* precipitada y aclarada con acetona (EPRA), así como la lipasa de CRL precipitada y aclarada con propanol (EPRP) se aplicaron a la resolución cinética de (\pm)-1-feniletanol en líquidos iónicos [BMIm] [PF6] mediante transesterificación con acetato de vinilo por Shah y Gupta (Shweta Shah & Gupta, 2007). Así, la EPRP de CRL originó un 26% de conversión (valor E = 153), mientras que la conversión obtenida con pH de la enzima lipasa afinado purificada fue del 7% (valor E = 12). En la **Tabla 1.7** se muestran los resultados obtenidos con algunas preparaciones lipásicas muy activas (Kapoor & Gupta, 2012).

1. INTRODUCCIÓN

Tabla 1.7. Conversiones obtenidas en reacciones catalizadas en medios orgánicos, mediante el uso de biocatalizadores activos constituidos por diversas lipasas

Lipasa	Reacción	Formulación Enzimática	Conversión (%)	Referencias
CALB	Resolución cinética de (\pm) feniletanol	Libre CLEAs ^c	4% (E ^a = nd ^b) 48% (E = 680)	(Hobbs et al., 2006)
Lipasa de <i>Candida rugosa</i>	Resolución cinética de (\pm) feniletanol	pH afinado EPRA ^d CLEAs PCMCs ^e	7% (E = 12) 26% (E = 153) 12% (E = 69) 53% (E = 79)	(Shweta Shah & Gupta, 2007)
	Esterificación (ácido octanoico y alcohol oleico)	Free CLEAs	47% 95%	(Kartal, Janssen, Hollmann, Sheldon, & Kilinc, 2011)
Lipasa de <i>Pseudomonas cepacia</i>	Transesterificación (producción de biodiésel a partir de aceite de mahua)	CLEAs PCMCs	92% (2.5 h) 99% (2.5 h)	(Kumari, Shah, & Gupta, 2007)
	Resolución cinética de (\pm) feniletanol	Libre CLEAs	36% (E = 53) 51% (E = 200)	(Hara, Hanefeld, & Kanerva, 2008)
	Resolución cinética de N- (2-etil-6-metilfenil) alanina	Libre CLEAs	50% (48 h), E > 100 50% (12 h), E > 100	(L. Zhao, Zheng, Gao, Ha, & Cao, 2008) (L. Zhao et al., 2008)
Lipasa de <i>Geotrichum</i> sp.	Transesterificación (producción de biodiésel a partir de aceite de cocina usado)	Libre PCMCs CLPCMCs ^f	29% 69% 72%	(Yan, Yan, Liu, Hu, & Wang, 2011)

^aE = enantioselectividad.

^bnd = no determinado.

^cCLEAs = reticulados agregados enzimáticos.

^dEPRA = enzima precipitado y se aclaró con acetona.

^ePCMCs = microcristales de proteína recubierta.

^fCLPCMCs = microcristales recubiertos de proteína reticulados.

1.6. PRODUCCIÓN ENZIMÁTICA DE BIODIÉSEL

La transesterificación catalizada por lipasas de materias primas oleosas o de grasas (TG) es considerada como una de las técnicas más prometedoras para la producción de biodiésel, entendida como una mezcla de ésteres de alquilo de ácidos grasos (FAAE). Este proceso se ha convertido en una tendencia creciente en la investigación científica en los últimos años. Así, se vienen publicando en los últimos años un número creciente de trabajos científicos, incluyendo artículos, revisiones, capítulos de libro, patentes y resúmenes de congresos (X. Zhao, Qi, Yuan, Du, & Liu, 2015), como se recoge en la **Figura 1.17**. Sin embargo, las plantas de biodiésel convencionales todavía mantienen procesos de transesterificación utilizando catalizadores químicos tales como álcalis en fase homogénea.

Procesos enzimáticos sólo se han aplicado en muy pocas plantas para la producción industrial de biodiésel (Wei Du, Li, Sun, Chen, & Liu, 2008; T. W. Tan, Lu, Nie, Deng, & Wang, 2010). Esto es principalmente debido a que el biocatalizador lipásico utilizado en el proceso enzimático es generalmente más caro que los catalizadores químicos alcalinos convencionales, tales como NaOH. De entre todos los sistemas biocatalíticos empleados para la producción de biodiésel, las lipasas inmovilizadas (ILs) muestran un gran potencial de aplicación industrial, ya que las ILs son más tolerantes a los disolventes, al calor y al glicerol, y también son mucho más fáciles de recuperar que las lipasas libres (FLs). (Bajaj, Lohan, Jha, & Mehrotra, 2010; Fjerbaek, Christensen, & Norddahl, 2009; Helwani et al., 2009; Robles-Medina, Gonzalez-Moreno, Esteban-Cerdan, & Molina-Grima, 2009; Shimada, Watanabe, Sugihara, & Tominaga, 2002).

1. INTRODUCCIÓN

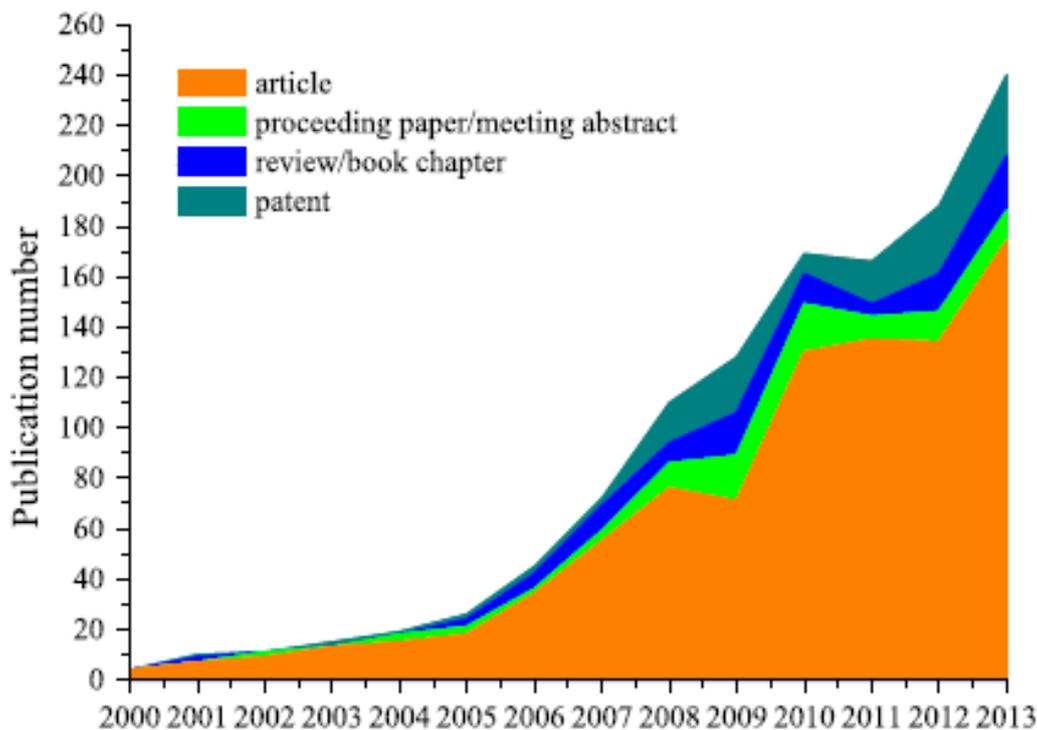


Figura 1.17. Evolución de las publicaciones científicas entre los años de 2000 a 2013 que se encuentran en la base de datos "Web of Science™" al hacer búsquedas con el término "biodiésel y lipasa", separados por tipos de documentos.

En comparación con la catálisis química, la catálisis enzimática se produce a temperaturas más suaves, por lo que se requiere menos consumo energético. Las lipasas tienen la capacidad de convertir aceites de diferentes fuentes, ya que catalizan tanto triglicéridos como ácidos grasos libres mediante transesterificación y esterificación respectivamente.

Esta propiedad de las lipasas las hace adecuadas para la conversión de materias primas no convencionales como el aceite de fritura usado y aceite de microalgas en biodiésel. Si se inmoviliza la enzima, ésta puede ser reutilizada, consecuentemente,

1. INTRODUCCIÓN

reduciendo los costos operativos asociados a la producción de biodiésel. En la catálisis enzimática, la separación y la purificación de los productos de reacción es más fácil que en el proceso químico. El biodiésel y glicerol obtenido a partir del proceso mediante catálisis enzimática son más puros en comparación con otros procesos. No hay generación de aguas residuales en la transesterificación enzimática lo que hace que el proceso más respetuoso con el medio ambiente (Bajaj et al., 2010; Fukuda, Kondo, & Noda, 2001; Helwani et al., 2009; S. Shah, Sharma, & Gupta, 2003; Shimada et al., 2002).

El producto obtenido por catálisis enzima, sin embargo, actualmente resulta caro debido principalmente al elevado costo que supone la tecnología enzimática, los tiempos de reacción elevados y sobre todo la dificultad de conseguir conversiones superiores al 90%. Sucede también, que la actividad de la enzima es inhibida en extensión variable por los alcoholes de cadena corta, sobre todo el metanol, utilizados como un aceptor de acilo en los procesos de transesterificación. La catálisis enzimática se considera que es una tecnología de futuro en la producción de un biocombustible similar al biodiésel, de carácter más renovable y respetuoso con el medio ambiente. Es muy atractiva también por la pureza del producto conseguida (Guldhe et al., 2015).

La transesterificación catalizada por lipasa puede llevarse a cabo en el intervalo de 30-40 °C, aunque ciertas lipasas procedentes de fuentes termófilas pueden trabajar a temperaturas aún más altas (Bajaj et al., 2010). Las Lipasas, como se explica en el **apartado 1.5.3.**, en las reacciones de transesterificación se comportan de manera regioespecífica, es decir actúan específicamente sobre ciertos enlaces éster en las moléculas de triglicéridos. Así, la mayoría de lipasas actúan específicamente en los enlaces éster de las posiciones 1,3 de la molécula. Las actividades de las lipasas regioespecífica sobre los triglicéridos pueden ser mantenidas y elevadas debido al efecto de la acil migración (Wei Li, Li, Li, Du, & Liu, 2010). Sin embargo, esto desde un

1. INTRODUCCIÓN

punto de vista económico no sería viable, dado el elevado tiempo de reacción exigido, por lo que las lipasas parecen ser más adecuadas para su aplicación en reacciones de transesterificación 1,3 selectivas, evitando la generación de glicerol como subproducto, como con las novedosas propuestas de biocombustibles Ecodiésel (FAEE+MG), Gliperol (FAME+Triacetina) o DMC-BioD (FAME+FAGC). (Calero et al., 2015)

Lipasas no específicas de *Candida antarctica*, *Candida cylindracea*, *Candida rugosa*, *Pseudomonas cepacia* y *Pseudomonas fluorescens* y lipasas 1,3-específicas de *Rhizopus oryzae*, *Thermomyces lanuginosus*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus delemar* y *Rhizomucor miehei* se utilizan comúnmente como catalizador para la producción de biodiésel (Guldhe et al., 2015).

El rendimiento de obtención de Biodiésel depende de varios factores, como la fuente de la lipasa, la técnica de aplicación de la misma, el aceptor de grupo acilo, temperatura, presencia de un disolvente, y relación molar aceite/alcohol. La catálisis se puede hacer utilizando tanto lipasas extracelular como intracelular. Las lipasas extracelulares se utilizan tanto libres como inmovilizadas, previamente extraídas y purificadas a partir de sus correspondientes microorganismos productores.

En el caso de las lipasas intracelulares se emplean células enteras inmovilizadas como catalizadores (Fukuda et al., 2001; Gog et al., 2012; Ranganathan, Narasimhan, & Muthukumar, 2008). Se pueden utilizar tanto procesos "batch" y en "continuo" para la conversión de TG en biodiésel mediante transesterificación catalizada por lipasas. Sin embargo, el proceso continuo es comparativamente más atractivo para su escalado hasta el nivel de producción industrial.

Aún así, estas lipasas inmovilizadas comercializadas son todavía demasiado caras para ser utilizadas para la producción de biodiésel. Se han desarrollado algunas

1. INTRODUCCIÓN

tecnologías novedosas de inmovilización, como por ejemplo mediante el uso de nanopartículas magnéticas, pero todavía están lejos de su aplicación industrial. Una de las soluciones para los elevados costos de la lipasa para la producción de biodiésel es aumentar su tiempo de vida en la transesterificación. En este punto, deben ser considerados los medios de reacción, los parámetros de operación, así como el diseño del reactor.

El diseño del reactor es importante para la ampliación de la producción enzimática de biodiésel. Comúnmente se aplican reactores de tanque agitado (STR), reactor de lecho empacado (PBR), o su combinación. Sin embargo, una gran mejora sigue siendo necesaria para mejorar la transferencia de masa minimizando la fuerza de mecánica que dañan para soportes y enzimas. Optimización y mejoras en las últimas etapas del proceso es crucial para obtener un biodiésel que cumpla con la correspondiente normativa.

La reacción de transesterificación para obtener biodiésel catalizada por lipasa está influenciada por varios factores tales como temperatura, relación molar metanol/aceite, la concentración de enzima, contenido en agua, velocidad de flujo en caso de proceso continuo, etc. Por lo tanto, la optimización de estos parámetros se convierte en crucial para obtener los máximos rendimientos. Los métodos estadísticos como la metodología de superficie de respuesta (RSM) han sido ampliamente utilizados para la optimización de la producción de biodiésel catalizados con lipasas (H.-C. Chen et al., 2011; Shieh, Liao, & Lee, 2003; J. Zheng, Xu, Liu, Zhang, & Yan, 2012)]. Los métodos estadísticos tienen la ventaja de estudiar un mayor número de parámetros en un menor número de dispositivos experimentales. Estos métodos también posibilitan una mejor comprensión de las interacciones entre los parámetros, así como el alcance de su influencia sobre la reacción.

1.6.1. APLICACIÓN DE CÉLULAS ENTERAS (LIPASAS INTRACELULARES) INMOVILIZADAS.

Como el costo de la lipasa extracelular es el factor limitante para su aplicación industrial con éxito, las lipasas intracelulares están ganando interés entre los investigadores (Fukuda, Hama, Tamalampudi, & Noda, 2008; T. Sun, Du, & Liu, 2011). En el proceso intracelular, las bacterias productoras de lipasas, levaduras y hongos filamentosos pueden ser utilizados eficazmente como biocatalizadores. La facilidad de inmovilización y la ubicación de las lipasas en la superficie celular son los criterios de selección clave para un organismo para ser utilizados como un biocatalizador de células enteras.

La ubicación de proteínas heterólogas en las superficies celulares de los microorganismos ha sido ampliamente utilizada en varios procesos biocatalizados. Como se ilustra en la **Figura 1.18**, un sistema de ubicación en la superficie de la célula de levadura de la lipasa de *R. oryzae* fue desarrollado por Matsumoto et al. (Matsumoto, Fukuda, Ueda, Tanaka, & Kondo, 2002). y se basa en el gen FLO1 que codifica una proteína de la pared celular similar a la lectina. Flo1p se compone de varios dominios, incluyendo una señal de secreción, dominio funcional floculación, GPI señal de unión de anclaje, y un dominio de anclaje a la membrana. En el sistema de visualización de la lipasa, el N-terminal de ROL con una prosequencia (ProROL) se fusionó al dominio funcional floculación FLO1p (Fukuda et al., 2008).

1. INTRODUCCIÓN

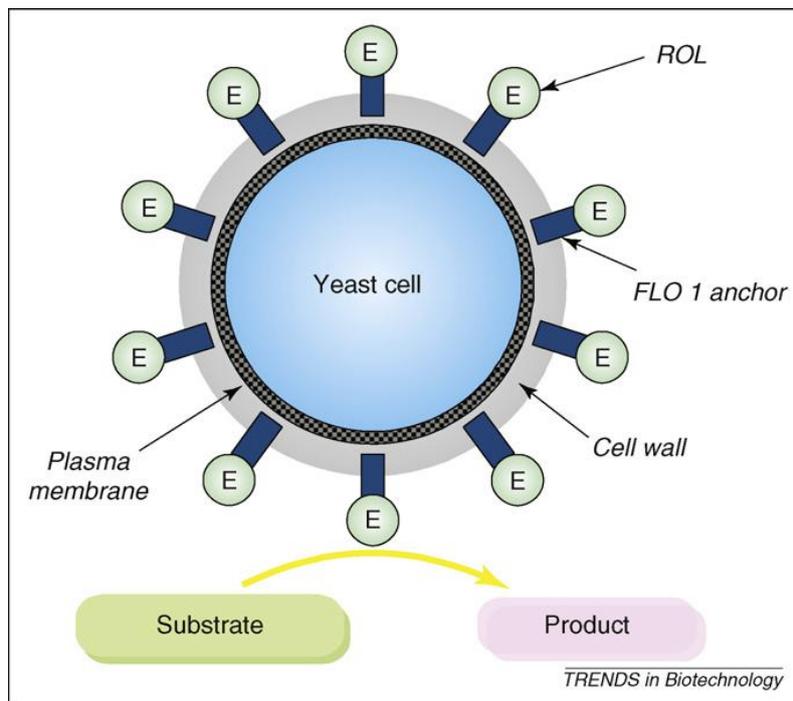


Figura 1.18. Diagrama esquemático de un biocatalizador de levadura de células enteras se presentan a través de ROL, una FOL 1 anclada. En este sistema se presentan lipasa, el N-terminal de ROL incluyendo una pro-secuencia Pro-ROL se ha fusionado con el dominio funcional de floculación P FLO, una proteína de la pared celular tipo lecitina de la levadura.

La aplicación de lipasas intracelulares reduce el coste de la catálisis, ya que los pasos de extracción de la enzima a partir del microorganismo y purificación se eliminan (**Figura 1.19**) (Robles-Medina et al., 2009). Así, la metanólisis del aceite de soja llevado a cabo usando células de *R. oryzae* inmovilizadas en esferas de poliuretano como soporte (BSP), en terc-butanol como disolvente, proporcionó un 72% de biodiésel en condiciones óptimas. La estabilidad de la célula como biocatalizador se mantiene por el uso de terc-butanol, con lo que se reduce la inhibición por metanol (Wei Li, Du, &

1. INTRODUCCIÓN

Liu, 2007). Por el contrario, la transesterificación de aceite de soja llevada a cabo en un sistema libre de disolvente, con cinco lipasas extracelulares comerciales y una lipasa intracelular, es decir como células enteras, de *Rhizopus chinensis*. Las lipasas de *C. antarctica*, *P. cepacia*, inmovilizadas en cerámica, *C. rugosa* y lipasa pancreática porcina (PPL) resultaron con un rendimiento de biodiésel de 30%, 27%, 27%, 5% y 24,1%, respectivamente, de forma similar a las células de *R. chinensis* que obtiene un rendimiento de biodiésel del 28,4 % .

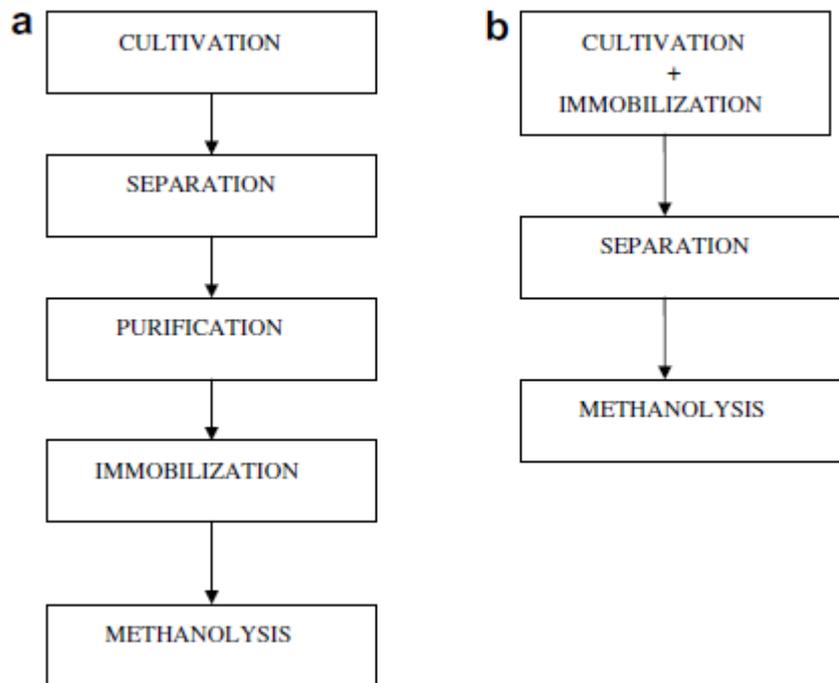


Figura 1.19. Comparación de los pasos involucrados en la inmovilización de lipasa extracelular (a) y lipasas intracelulares (b).(Ranganathan et al., 2008)

1. INTRODUCCIÓN

He et al. (He, Xu, Teng, & Wang, 2008) hizo hincapié en el potencial de la catálisis de lipasa intracelular en la producción a escala industrial debido a su bajo coste y su rendimiento comparable a la de lipasas extracelulares comerciales. Ban et al. (Ban et al., 2002) estudiaron el efecto del tratamiento de reticulación con glutaraldehído sobre las células de *R. oryzae* inmovilizados en esferas de poliuretano (BSP). Así, la transesterificación del aceite de soja se llevó a cabo mediante la adición de metanol en una manera escalonada y la conversión fue monitoreada durante seis ciclos en reactor "batch" de 72 h cada uno. Este sistema biocatalítico conformado por células enteras tratadas con glutaraldehído mostró una conversión del 70-83% en seis ciclos "batch", mientras que la eficiencia de conversión de las células no tratadas se redujo al 50% después del sexto ciclo.

Respecto al efecto de la fuente de carbono en el cultivo de células que serán usadas como un catalizador de células enteras, se estudió por Zeng et al. (Zeng, Du, Liu, Liu, & Dai, 2006). Se comprobó, como el tratamiento previo con aceite y ésteres de metilo influye en la eficiencia catalítica de las células de *R. oryzae*. Éstas fueron cultivadas con medios que contenían soja, aceite de oliva y aceite de semilla de algodón como fuente de carbono. También se probó cómo las células cultivadas en aceite específico como fuente de carbono mostraban una alta actividad catalítica en la conversión de ese mismo aceite cuando se utilizaba como materia prima para producir biodiésel. Esta tendencia se atribuye a la acción del aceite como fuente de carbono que actuaría como inductor. Estudiaron el efecto del pretratamiento con aceite durante 24, 48 y 72h de cultivo en la actividad catalítica. El pretratamiento de aceite de 72h mostró un aumento en la velocidad de reacción inicial a 24.78 mmol / min, lo que representa un 204% más que el control, respecto a los resultados obtenidos sin tratamiento previo. El efecto del pretratamiento con éster metílico mostró que

1. INTRODUCCIÓN

mientras más largo es el tiempo de pretratamiento, menor es la velocidad de reacción inicial (Zeng et al., 2006).

Las Lipasas intracelulares se pueden utilizar en la producción continua de biodiésel, incluso se puede realizar el escalado a nivel industrial. Células enteras inmovilizadas sobre BSP pueden ser aplicadas en un reactor de lecho empacado (PBR), con una mezcla de reacción que contiene aceite y el alcohol pasando a través de la columna para obtener los ésteres de alquilo de ácidos grasos (FAAE). De forma similar, células recombinantes de *Aspergillus oryzae* expresando lipasas de *Fusarium heterosporum* inmovilizadas en BSP por Yoshida et al. (Yoshida et al., 2012), se utilizaron para la transesterificación de una emulsión acuosa de aceite vegetal con adición escalonada de metanol. La relación molar aceite/metanol óptima fue de 4,25: 1, que se añadió en una programación optimizada de seis etapas (primero - 1 M; segunda - 1 M; tercera - 0,75 M; cuarta - 0,5 M; quinta - 0,5 M; y sexto - 0,5 M; donde M expresa la relación molar de metanol con respecto al aceite). La Transesterificación se llevó a cabo con una amplia gama de contenidos de agua (3-20%). El producto obtenido a partir de la sexta reacción contenía 96,1% de éster metílico y 0,15% de agua.

1.6.2. TRANSESTERIFICACIÓN ENZIMÁTICA CON MATERIAS PRIMAS DE BAJO COSTO Y RICAS EN ÁCIDOS GRASOS LIBRES.

La materia prima es lo que contribuye en mayor proporción en los costos de producción de biodiésel. Los aceites comestibles podrían utilizarse como materia prima para la producción de biodiésel, pero la seguridad alimentaria es un factor limitante en este sentido. Sin embargo, las plantas oleaginosas comestibles y no comestibles, compiten con los cultivos alimentarios por las tierras de cultivo, lo que al final conduce a un riesgo para la seguridad alimentaria. Así mismo, una gran cantidad de agua y fertilizantes se utilizan para cultivar estas plantas oleaginosas, lo que aumentaría el costo de la producción de biodiésel y perjudicaría la tasa de carbono emitido, de carácter no renovable. Es por esto que el uso de las grasas de aceite de cocina usado y grasas residuales de todo tipo, de bajo coste están ganando interés, en su uso como materia prima. El uso de estas fuentes de triglicéridos sirve tanto para la producción de biocombustibles con una mínima tasa de emisión de CO₂, como para implementar la gestión de residuos urbanos e industriales. Sin embargo, se requiere una infraestructura logística para la recogida de sus fuentes de producción, hogares, restaurantes y plantas de procesamiento de alimentos, para conseguir una disponibilidad suficiente para la producción a gran escala de biodiésel.

El aceite de cocina usado, así como algunos aceites no comestibles, y el aceite de microalgas, tienen un elevado contenido de ácidos grasos libres (FFA) y de humedad (Y. Chen et al., 2009). Esto dificulta el rendimiento del biodiésel en el caso de la catálisis básica, mientras que las lipasas han mostrado tolerancia hacia estos factores (Shinji Hama & Kondo, 2013). Las lipasas pueden catalizar la transesterificación, así como reacciones de esterificación, y por lo tanto pueden ser utilizadas para materias primas que tengan elevado contenido de ácidos grasos libres. Como las lipasas catalizan la transesterificación de los triglicéridos y la esterificación de

1. INTRODUCCIÓN

los ácidos grasos libres (FFA), mejoran el rendimiento cuando se utilizan tales materiales como materia prima. A pesar del alto costo de la enzima, su aplicación en la conversión de las materias primas de baja calidad, puede hacer viable económicamente el proceso general de producción de biodiésel.

Chen et al. (Y. Chen et al., 2009) estudiaron la conversión del aceite de cocina usado (WCO) utilizando lipasa inmovilizada de *Candida* en el reactor de lecho fijo. Encontraron que bajo condiciones de reacción óptimas, 45 °C y pesos de reactivos en proporciones de 25: 15: 10: 100 para la lipasa/hexano/agua/WCO con un flujo de 1.2 ml/min, un contenido del 91,08% de FAME puede ser obtenido en el caudal de productos. A tasas de flujo más bajas, el metanol ha tenido tiempos de contacto más prolongados con la enzima reduciendo así su actividad.

Los residuos derivados de grasas animales disponibles son generalmente subproductos de mataderos e industrias de procesamiento de carnes. Su uso como alimento para animales ha disminuido debido a la transmisión de enfermedades, como la Encefalopatía espongiforme ("mal de las vacas locas"). El poder calorífico superior y el elevado número de cetano son las características más atractivas del biodiésel obtenido de los derivados de grasas animales. Al-Zuhair et al (Al-Zuhair, Hussein, Al-Marzouqi, & Hashim, 2012) abogaron por el uso de la grasa de desechos de la carne de cordero como un material barato, aplicando transesterificación enzimática para la producción de biodiésel. Aplicaron CO₂ supercrítico tanto como medio de extracción y de reacción. En el proceso de producción continua SC-CO₂ con un caudal de 0,5 ml/min bajo una presión de 200 bar, las temperaturas de extracción y transesterificación se mantuvieron en 45 y 50 °C, respectivamente. Con metanol en una relación molar con la grasa de 10:1, el rendimiento máximo biodiésel podría llegar a 53,5 %. No es conveniente que el metanol exceda la relación molar con la grasa de 5:1 para

1. INTRODUCCIÓN

mantener la actividad de la enzima durante un período más prolongado de aplicación, como sucede en el proceso continuo.

Cuando la relación molar con la grasa es de 10:1, la actividad enzimática se redujo a 18%, en comparación con su actividad inicial tras la tercera adición de la materia prima en el proceso continuo. Sin embargo, cuando la cantidad de metanol se mantuvo en la relación molar de 5:1, después del tercer ciclo se mantuvo un 79% de la actividad enzimática. Un enfoque similar propuso Taher y colaboradores (Taher, Al-Zuhair, AlMarzouqui, & Hashim, 2011), que investigaron la producción de biodiésel a partir de residuos de grasa animal y transesterificación catalizadas enzimática en condiciones SC-CO₂. El rendimiento de biodiésel puede llegar hasta el 40% en condiciones óptimas de reacción: 30% de carga enzimática, 4:1 de proporción metanol/grasa, 200 bar de presión a 50 °C tras 24 h de reacción.

1.6.3. ANÁLISIS TECNO-ECONÓMICO Y CICLO DE VIDA DE LA PRODUCCIÓN ENZIMÁTICA DE BIODIÉSEL.

El análisis técnico económico y el ciclo de vida es importante para dar sentido a esta tecnología y posibilitar su aplicación con éxito a escala comercial. Sin embargo, hay muy pocos estudios disponibles en este sentido. También se hace imperativo comparar esta tecnología alternativa con la técnica convencional. Jegannathan et al. (Jegannathan, Eng-Seng, & Ravindra, 2011) investigaron la economía del proceso de producción de biodiésel utilizando catalizador alcalino, enzima libre e inmovilizada.

Aunque muchos procesos se han desarrollado para la inmovilización de lipasas en laboratorio, sólo unas pocas técnicas han sido exitosamente comercializadas. El obstáculo importante en el camino para la viabilidad técnica es el alto costo de la inmovilización. Por ejemplo, el precio de mercado de Novozym 435 es del orden de 1000 \$ / kg (X. Zhao et al., 2015). Para reducir costos, el soporte debe ser fácil de sintetizar o disponible en el mercado a bajo precio. El proceso de inmovilización debe ser eficiente, tal que posibilite la recuperación de las proteínas y la retención de sus actividades enzimáticas. Las lipasas inmovilizadas (ILs) deben tener una alta estabilidad para evitar la lixiviación de las enzimas o pérdida de actividad. Entre las IL comerciales, la Novozyme 435 es la más conocida y aplicada para la producción de biodiésel.

La evaluación técnico-económica es importante para la estimación de los costos de producción y la determinación de las unidades más costosas para una mayor optimización. La evaluación económica generalmente consiste en varios pasos: desarrollo de diagramas de procesos flujo, diagramas de tiempo, listas de equipo junto con estimaciones del costo del equipo, costo de la planta y de manufactura (Alves et al., 2013) La mayoría de las evaluaciones técnico-económicas se basan en los resultados de la simulación de procesos. Una vez que la hoja de flujo, el balance de

1. INTRODUCCIÓN

masa y el consumo de energía se determinan, además del tamaño del equipo y la estimación del coste de los equipos de proceso, se puede llevar a cabo el cálculo de la inversión de capital total (TCI).

Se consideró una capacidad de producción de 10^3 toneladas de biodiésel en el proceso de reactor "batch". El costo inferior de producción resultó ser de 1.166,67 \$ / tonelada para el catalizador alcalino. Entre los biocatalizadores, la enzima inmovilizada ha mostrado un menor costo de producción del biodiésel, de 2.414,63 \$ / tonelada, en comparación con la enzima libre (\$ 7,821.37 / tonelada). El biocatalizador conformado por la enzima inmovilizada mostró un menor precio debido a su potencial de reutilización. Simulación de procesos y estudios de evaluación económica realizados por Sotoft et al. (Sotoft, Rong, Christensen, & Norddahl, 2010) para la producción de biodiésel a partir de aceite de colza, mediante transesterificación catalizada por enzimas, en un sistema libre de solvente teniendo presente el precio de la enzima (762,71 € / kg enzima) y futuro precio de la misma (7,63 € / kg enzima) demostró que este proceso tiene un gran potencial para su aplicación a escala industrial. El precio del producto estimado por Sotoft et al. (Sotoft et al., 2010) con el actual precio de la enzima fue 0,73-1,49 € / kg de biodiésel, mientras que con el futuro precio de la enzima fue 0,05 hasta 0,75 € / kg.

Se hizo un estudio de análisis del ciclo de vida por Harding et al. (Harding, Dennis, von Blottnitz, & Harrison, 2008) donde comparan la catálisis química y catálisis enzimática en la producción de biodiésel. El estudio mostró que la ruta bioquímica tiene ventaja sobre la ruta química, en términos de un proceso de purificación más simple y de ahorro energético. El análisis del ciclo de vida también mostró que la ruta biocatalítica es más ecológica, el componente que colabora en el calentamiento global, la acidificación y la oxidación fotoquímica en el caso de la catálisis enzimática se redujeron en un 5%. La reducción en la toxicidad de aguas residuales fue de

1. INTRODUCCIÓN

aproximadamente un 12%, mientras que la reducción de la toxicidad acuática marina y de la toxicidad humana eran casi del 10%. La reducción de la ecotoxicidad terrestre fue del orden del 40%, debido principalmente al evitar la etapa de neutralización que requieren los ácidos.

A pesar de que el costo de la catálisis enzimática es más elevado, proporciona beneficios ambientales sobre el proceso convencional. Con las nuevas estrategias enzimáticas, los costos asociados a la tecnología enzimática se pueden reducir mediante la mejora de su rendimiento y estabilidad catalítica. El análisis técnico económico y del ciclo de vida sugiere el potencial prometedor de la catálisis enzimática para la producción de biodiésel a escala industrial.

La viabilidad económica de la producción enzimática de biodiésel depende de una serie de factores. Estos factores incluyen principalmente los costos de las materias primas oleosa, alcohol y enzima; los parámetros de proceso, tales como la conversión, tiempo de retención para la transesterificación, rendimiento de recuperación biodiésel, el tiempo de vida media de la lipasa y la pérdida de disolvente (si se usa); diseño del proceso con respecto a reciclar el agua y la integración del calor; y la gestión de subproductos. Se ha encontrado que el costo de la lipasa contribuye en gran parte al coste total de producción. La ampliamente utilizada IL, Novozym 435, tiene un elevado precio por kilogramo, lo que indica que se requiere una muy alta productividad para que el proceso sea rentable (Nielsen & Rancke-Madsen, 2011).

Como ha estudiado Jegannathan et al. (Jegannathan et al., 2011), el proceso cuando la IL se reutiliza en 5 ciclos de reacción "batch", el coste de fabricación mediante catálisis con IL es dos veces la del proceso alcalino. Consecuentemente, la reutilización de ILs es importante para reducir el costo de producción de biodiésel.

1. INTRODUCCIÓN

Como se muestra en la **Figura 1.20**, las veces que se produce la reutilización de la IL tiene una influencia significativa en el precio de la enzima para la producción de biodiésel catalizada por ILs. Se puede estimar que para conseguir un costo de la enzima menor de 0,1 \$ / kg de biodiésel, la IL debe ser reutilizada hasta más de 320, 210, 160, 50 y 20 ciclos de reacción sin pérdida de actividad de la enzima lipasa cuando el precio son 1500, 1000, 750, 200 y 100 \$ / kg, respectivamente. Otra solución prometedora es aumentar la actividad específica de la IL para disminuir la carga de enzima utilizada para la transesterificación. Esto se podría conseguir mediante la modificación de la lipasa con los enfoques de ingeniería de proteínas.

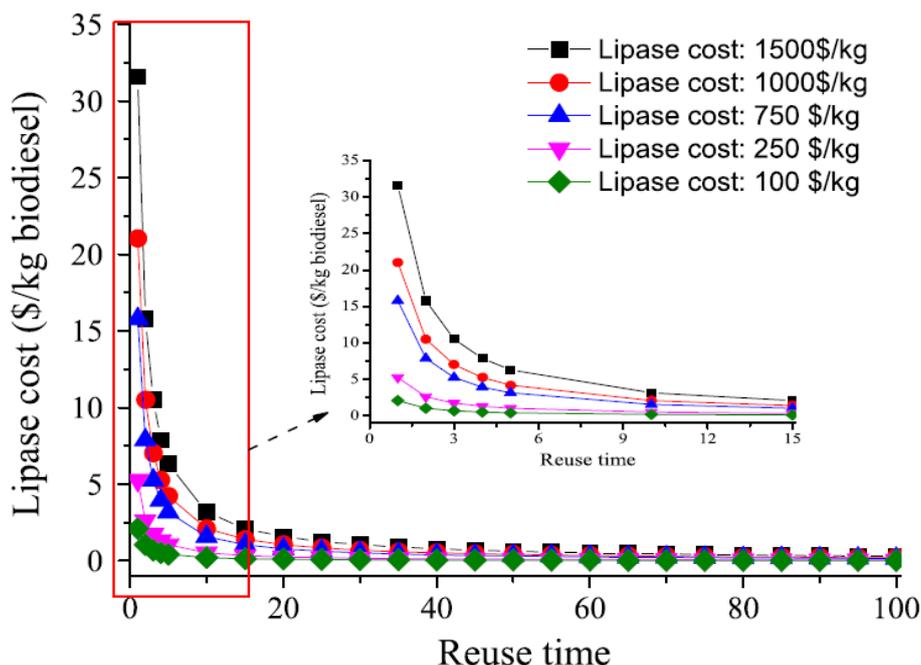


Figura 1.20. Efecto del número de ciclos de reacción de la IL sobre el costo estimado de la lipasa según diferentes precios de enzima. Carga de IL: 2% sobre la base de materia prima de aceite en bruto; conversión de aceite para biodiésel: 95%.

1. INTRODUCCIÓN

Para trabajos futuros, se recomienda que una serie de aspectos deben ser considerados, para mejorar la competitividad económica de la producción enzimática de biodiésel:

- *Aumentar la estabilidad de las lipasas inmovilizadas (ILs) durante la transesterificación:* Esto se puede hacer mediante la prevención de la lixiviación de lipasas desde los soportes y la desnaturalización, que provoca la pérdida de la actividad causada por la acumulación de alcohol y glicerina o por la fuerza de agitación. El aumento de la interacción entre la lipasa y el soporte debe llevarse a cabo sin que la actividad de la lipasa no sea notablemente disminuida. La adición de alcohol en múltiples pasos y la eliminación simultánea de glicerol puede aumentar la estabilidad de la IL, pero el proceso todavía necesita optimización para que sea menos complejo y más eficiente. Para mejorar la tolerancia de las ILs hacia el alcohol y/o glicerol, la modificación biológica o química de la lipasa por ingeniería proteómica puede ser una vía prometedora.
- *Desarrollar nuevos reactores y averiguar la "ventana de operación":* ya que la transferencia de masa es importante para la producción enzimática de biodiésel, el reactor utilizado para la reacción debe generar una buena operación de mezclado; sin embargo, no debe causar daño a los soportes ni la pérdida de actividad de la lipasa.
- *Estudio Integral e intensivo de la cinética de la conversión de aceite en biodiésel catalizada por ILs:* Con el fin de comprender los mecanismos de conversión de aceite en biodiésel bajo la catálisis de ILs, los productos intermedios tales como ácidos grasos, monoglicéridos y diglicéridos deben determinarse. Para estudios de macrocinética, transesterificación, esterificación, acil migración, hidrólisis y pérdida de actividad de la lipasa se deben considerar en los modelos. Sin embargo, para

1. INTRODUCCIÓN

estudios de micro-cinética, la limitación de transferencia de masa causada por las difusiones internas y externas deben ser evaluadas.

- *Se debe realizar una simulación rigurosa para obtener más datos precisos.* En la mayoría de los trabajos de simulación, las materias primas oleosas están simplemente modeladas utilizando trioleato de glicerilo. Sin embargo, la materia prima de aceites, en realidad contiene cadenas de ácidos grasos principalmente en el intervalo de 14-18 C.
- *La integración y optimización de procesos debe investigarse más.* Dado que el costo total de producción depende de todo el proceso en lugar de una o dos unidades, la integración de procesos con la consideración de reciclar el agua y calor debe llevarse a cabo. La optimización del proceso total se debe hacer con el objetivo final de reducir el coste de producción. Un análisis sensible de las principales variables como el precio de las ILs, el precio de materias primas, la conversión de aceite a biodiésel y pérdida de disolvente (si se utiliza) se debe realizar.

1.6.4. ESCALADO EN LA PRODUCCIÓN ENZIMÁTICA DE BIODIÉSEL.

La evolución reciente de la transesterificación catalizada enzimáticamente han aumentado las perspectivas de este proceso como una técnica para la producción de biodiésel a escala industrial. Hay una planta a escala piloto con capacidad de producción de 6.482 toneladas año⁻¹, localizada en Shangai donde se emplea una lipasa barata extraída de *Candida sp.* 99-25 (Yun, Wang, Feng, & Tan, 2013).

El principal desafío en el escalado de esta técnica, actualmente es el costo de la enzima lipasa, mucho mayor que el catalizador químico convencional. Aunque, si se considera el proceso general, la reciente evolución y ventajas de los catalizadores lipásicos pueden mejorar la economía de la producción de biodiésel a escala de planta industrial. Los productos de calidad obtenidos reducen el procesamiento adicional de purificación y costes. En este caso el glicerol es obtenido como un subproducto de alta calidad, que puede tener un buen precio de mercado y se puede utilizar en diversas aplicaciones en los alimentos, la industria cosmética y farmacéutica (B. Singh, Guldhe, Rawat, & Bux, 2014). Los requisitos de menor temperatura y presión reducen la entrada de energía del proceso. La transesterificación catalizada por enzimas se considera como un proceso "verde", que genera menos aguas residuales en comparación con el proceso catalizado químicamente. Esto no sólo proporciona beneficios medioambientales sino también minimiza el costo de gestión de residuos, así como de todo el proceso en la planta a escala industrial. Las enzimas lipasas tienen además la capacidad de convertir las materias primas de bajo costo, tales como el aceite de cocina usado y grasas animales con eficacia.

El costo de las enzimas es el principal inconveniente de la adopción de esta técnica, pero con el desarrollo reciente de aplicaciones biotecnológicas y la disponibilidad de diversas fuentes de materias primas baratas están reduciendo este

1. INTRODUCCIÓN

impacto. La inhibición por el metanol y una larga exposición a disolventes reducen la estabilidad de la enzima inmovilizada, pero ciertos tratamientos previos han mostrado resultados prometedores para mejorar la estabilidad de las lipasas. Estabilidad y actividad mejorada hacen posible la reutilización prolongada de lipasas inmovilizadas, lo que puede mejorar la economía del proceso. Con los avances recientes en la producción enzimática de biodiésel se podría lograr un enfoque más verde y sostenible para ser implementado en las plantas de biodiésel a gran escala.

Para hacer más viable y sostenible la producción de biodiésel, se ha considerado que en vez realizarse la producción en macroplantas industriales, al estilo de las refinerías de petróleo donde se obtiene el diésel convencional, podrían ser más apropiadas plantas de mediano tamaño, del tipo de las plantas piloto, distribuidas por ciudades o regiones, que posibiliten un apropiado reciclaje de aceites domésticos, vegetales o grasas animales, mediante la producción de biocombustibles, para su venta o su autoconsumo, en cooperativas rurales. Estas plantas de producción podrían estar asesoradas por empresas spin-off asociadas a universidades u otras empresas de base tecnológica, para posibilitar y orientarlas en la producción enzimática de Biodiésel, o incluso más convenientemente, mediante catálisis enzimática para producir Ecodiésel (D. Luna et al., 2014).

1.7. BIOCOMBUSTIBLES QUE INTEGRAN LA GLICERINA EN FORMA DE DERIVADOS ACILADOS.

Para evitar los problemas asociados con la generación de glicerina en el proceso convencional, hay descritos una serie de métodos alternativos que, no sólo evitan la formación de glicerina, sino que además proporcionan una mayor eficiencia atómica, al integrar la glicerina como un derivado, soluble en la mezcla de FAME, en el conjunto del biocombustibles y no producir así glicerina como subproducto. En efecto, entre los diferentes métodos descritos en la **Figura 1.3**, para la conversión de aceites vegetales en biocombustibles, los biocarburantes que integran la glicerina no sólo evitan la generación de residuos, sino que deberán producir un incremento ($\approx 10\%$) en el rendimiento del proceso, al integrar la glicerina en el producto de la reacción. Esto habrá también de suponer una reducción importante de los costes del proceso, al evitarse los tratamientos posteriores de lavado y limpieza del biodiésel y la consiguiente gestión de las aguas residuales generadas. En este sentido, la limpieza de la glicerina de los biocombustibles es una operación inevitable cuando ésta se genera en el proceso, ya que su presencia en el combustible desemboca en una oxidación hasta acroleína y posterior polimerización, que genera depósitos carbonosos en los inyectores, pistones y válvulas, reduciendo la eficiencia y vida útil de los motores (**Figuras 1.9 y 1.10**).

Otro aspecto a considerar es el elevado poder lubricante de estos biocombustibles, ya que en investigaciones recientes se ha demostrado también que los componentes minoritarios del biodiésel estándar (que se consideran contaminantes según la norma EN 14214), entre ellos los FFA y los MG, son esencialmente responsables de la elevada lubricidad que se obtiene en las mezclas de biodiésel y diésel fósil, aún con niveles muy bajos de estos componentes. En este

1. INTRODUCCIÓN

sentido se ha de mencionar que los FAME muy puros, que cumplen estrictamente la norma EN 14214, presentan una elevada reducción de la lubricidad, respecto al biodiésel que contiene estos compuestos, aún en muy pequeñas proporciones. Cabe esperar que la presencia de mayores cantidades de MG y/o FFA así como de diversos derivados de éstos, en un nuevo tipo de biocombustible que incorpora la glicerina, aumente la lubricidad del biocombustible, que es una importante característica diferencial de los biocombustibles, mejorando el funcionamiento y la vida útil de los motores.

En este sentido, la transformación de la glicerina residual en compuestos ramificados que contienen oxígeno, está siendo considerada en la actualidad como una solución interesante para dar salida a los crecientes stocks de glicerol (Melero, Vicente, Morales, Paniagua, & Bustamante, 2010; Mota et al., 2010). Así, varios compuestos oxigenados, obtenidos por transformación de glicerol a través de eterificación, esterificación y acetalización, han sido evaluados positivamente como aditivos o componentes adicionales adecuados para la formulación del biodiésel.

La adición de estos compuestos no sólo mejora el comportamiento de las propiedades del biodiésel a bajas temperaturas, es decir, punto de enturbiamiento o "cloud point" (CP), punto de fluidez, "pour point" (PP), cold filter plugging point (CFPP) temperatura o punto de oclusión del filtro en frío (POFF), y la viscosidad, sino que además no alteran otros parámetros característicos importantes para la calidad del biodiésel. De hecho, la mayoría de los derivados oxigenados estudiados ni mejoran significativamente, ni ejercen ningún efecto negativo significativo en la mayoría de los parámetros que definen la calidad del biodiésel.

Junto con esta estrategia, que consiste en la obtención de derivados oxigenados adecuados a partir de la glicerina obtenida después de su separación de la

1. INTRODUCCIÓN

reacción de transesterificación, otro objetivo de gran interés en la actualidad es la producción de estos derivados de la glicerina en la misma reacción de transesterificación. Así, en una sola reacción, se obtienen nuevos biocombustibles que integran la glicerina, transformada en un derivado miscible con los ésteres metílicos o etílicos de los ácidos grasos (FAME o FAEE) obtenidos simultáneamente en el proceso de transesterificación. Básicamente, esto se consigue empleando algún éster, en lugar del alcohol metílico o etílico aplicado en el proceso convencional. Por lo tanto, si algún compuesto derivado de la glicerina se obtiene al mismo tiempo que los FAME (o FAEE) en un proceso de interesterificación, se obtiene un nuevo tipo de biocombustible en una sola reacción, evitando la formación de glicerina pura.

Esta metodología evita así la separación de la glicerina antes de su transformación, y las operaciones de lavado del biodiésel convencional, lo que comparativamente simplifica el proceso de forma muy importante. Además, los compuestos obtenidos como derivados de glicerol (Melero et al., 2010; Mota et al., 2010), no sólo evitan la generación de residuos, sino que al convertirse en biocombustibles aumentan los rendimientos del proceso, por encima del 12% en peso nominal, mediante la incorporación de los derivados de la glicerina en los productos de reacción. De esta forma se consigue prácticamente el 100% de eficiencia atómica. En este sentido, en la actualidad se están investigando una serie de metodologías novedosas para preparar ésteres a partir de lípidos, utilizando diferentes aceptores de acilo que ofrezcan directamente co-productos alternativos de la glicerina, solubles en las mezclas de los FAME, que normalmente constituyen el biodiésel convencional (Adamczak, Bornscheuer, & Bednarski, 2009; Vasudevan & Briggs, 2008).

Estos procesos de interesterificación se pueden realizar con los mismos catalizadores aplicados en los procesos de transesterificación convencionales (catalizadores homogéneos o heterogéneos, ácidos o básicos, lipasas, condiciones

1. INTRODUCCIÓN

supercríticas, etc.), aunque en la actualidad la mayoría de estos procesos, cuando se aplica a la producción de biocombustibles, se llevan a cabo usando diferentes lipasas (Adamczak et al., 2009), con las que en lugar de utilizar metanol, se emplean diferentes ésteres alquílicos como los acetatos de metilo o etilo, y los carbonatos de dimetilo o etilo. Estas mezclas que incluyen moléculas derivadas de la glicerina, tienen propiedades químico-físicas adecuadas para ser empleadas como nuevos biocombustibles. La eficiencia atómica del proceso aumenta a prácticamente el 100%, dado que el número total de átomos que participan en la reacción forman parte al final de la mezcla que constituye el biocombustible, ya que, incluso los reactivos utilizados permanecen junto a los productos de reacción obtenidos para ser utilizado directamente como biocombustibles.

1.7.1. BIOCOMBUSTIBLES QUE INTEGRAN EL GLICEROL EN FORMA DE TRIACETATO DE GLICEROL.

Mediante la reacción de interesterificación de triglicéridos con acetato de metilo, en presencia de catalizadores ácidos fuertes, según la **Figura 1.21**, se obtienen mezclas de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) y triacetato de glicerol (o triacetina) que podrían ser utilizados como un nuevo tipo de biocombustibles ya patentado como Glicerol, que presenta propiedades como combustible comparables con las del biodiésel convencional, pero que a su vez mejora notablemente la viabilidad económica de la producción de este biocombustible (Kijenski, Rozycki, Lipkowski, & Walisiewicz-Niedbalska, 2007).

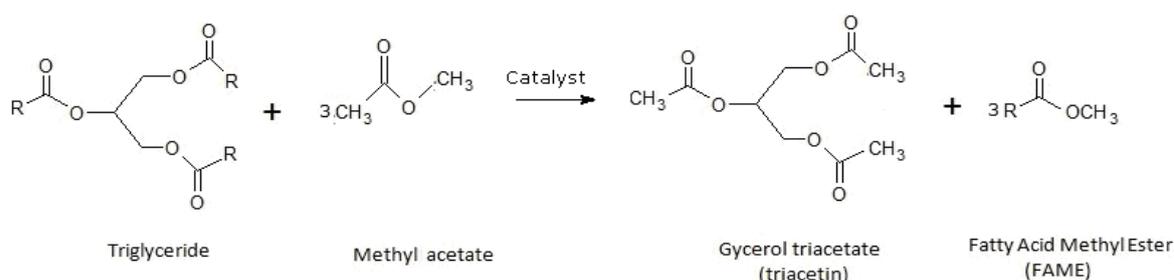


Figura 1.21. El Gliperol® es un nuevo biocombustible patentado por el Instituto de Investigación de Química Industrial, Varsovia (Polonia), formado por una mezcla de tres moles de FAME y un mol de triacetina, obtenido por interesterificación de triglicéridos con acetato de metilo, bajo fuertes condiciones ácidas. (Kijenski et al., 2007)

Este biocombustible queda constituido por una mezcla de tres moléculas de FAMEs y una molécula de triacetina, que se obtiene mediante la interesterificación de un mol de TG con tres moles de acetato de metilo, utilizando un catalizador ácido, con una relación molar aceite/acetato de de metilo, en el rango 1:3 a 1:9, y temperaturas en el rango de 40-200 °C. Sin embargo, la mayoría de estudios posteriores se han

1. INTRODUCCIÓN

realizado aplicando lipasas como catalizadores en sistemas libres de disolventes (Ayhan Demirbas, 2008; Usai, Gualdi, Solinas, & Battistel, 2010; Vasudevan & Fu, 2010) o en líquidos iónicos (Ruzich & Bassi, 2010), en condiciones supercríticas (Campanelli, Banchemo, & Manna, 2010; Niza, Tan, Ahmad, & Lee, 2011; Niza, Tan, Lee, & Ahmad, 2013; Saka & Isayama, 2009; K. T. Tan, Lee, & Mohamed, 2010), por interesterificación asistida por ultrasonidos (Maddikeri, Pandit, & Gogate, 2013) o con catalizadores homogéneos básicos (Abraham Casas, Jesus Ramos, & Perez, 2011, 2012, 2013).

A este respecto, se han optimizado los parámetros cinéticos para obtener Glicerol mediante la interesterificación de aceite de girasol con acetato de metilo, empleando catalizadores básicos convencionales como hidróxido de potasio, metóxido de potasio y glicolato de polietileno (Abraham Casas et al., 2011, 2012, 2013). Los experimentos de interesterificación química se realizaron a 30 - 50 °C y con relaciones molares de catalizador a aceite de 0,1:1, 0,15:1 y 0,2:1, respectivamente. Los resultados obtenidos muestran la presencia de diacetina y monoacetina, junto a la triacetina. En estas condiciones, cuando se utiliza metóxido de potasio como catalizador, se alcanza el equilibrio dentro de los primeros 15 minutos de la reacción. Los contenidos de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) y triacetina en el producto de reacción fueron 76,7% y 17,2%, respectivamente.

A pesar del carácter más benigno, desde el punto medioambiental, del acetato de etilo, este aceptor de acilo está menos estudiado que el acetato de metilo (Adamczak et al., 2009; Jeong & Park, 2010; Kim, Jung, Park, & Park, 2007; Modi, Reddy, Rao, & Prasad, 2007), aunque los resultados descritos indican un comportamiento muy similar al acetato de metilo en la interesterificación con lipasas. Sin embargo, en este caso se obtienen los correspondientes FAEE (en lugar de FAME) con la triacetina.

1. INTRODUCCIÓN

Respeto a la influencia de la triacetina en el rendimiento del motor, hay un gran número de estudios al respecto, porque esta molécula se considera una buena solución para la valorización de la glicerina residual obtenida en la producción convencional de biodiésel (Balaraju et al., 2010; Ferreira, Fonseca, Ramos, Vital, & Castanheiro, 2011; Goncalves, Pinto, Silva, & Mota, 2008; Melero et al., 2010; Rahmat et al., 2010). Se ha demostrado que la triacetina es un aditivo anti-golpeo en los motores diésel de inyección directa (DI), cuando se adiciona al biodiésel. El uso de triacetina como aditivo también mejora el rendimiento del motor, y reduce las emisiones. Entre todas las mezclas de combustibles analizadas, la combinación de 10% en peso de triacetina con biodiésel es la que muestra los mejores resultados (A. Casas, Ruiz, Ramos, & Perez, 2010).

Por tanto, se puede concluir que la interesterificación de triglicéridos con acetato de metilo o etilo puede ser una metodología adecuada para obtener biodiésel convencional (FAME o FAEE), incluyendo también una cierta cantidad de un aditivo bien reconocido como es la triacetina.

1.7.2. BIOCOMBUSTIBLES QUE INTEGRAN EL GLICEROL EN FORMA DE CARBONATO DE GLICEROL.

El carbonato de dimetilo (DMC) también se puede utilizar como un reactivo de interesterificación para la fabricación de ésteres de la glicerina a partir de triglicéridos, se consiguen directamente para generar carbonatos de glicerol como co-productos alternativos, solubles en las disoluciones de FAME que constituyen el biodiésel. La reacción es bastante atractiva, dado que el DMC es considerado como un prototipo de reactivo "verde" dado que no es nocivo ni para la salud ni para el medio ambiente. A este respecto, hay que indicar que las materias primas para la producción del DMC, es decir, metanol y monóxido de carbono, se derivan de gas de síntesis que pueden ser producidos a partir de la conversión termoquímica de la biomasa (Y. Li, Zhao, & Wang, 2005).

Por lo tanto, un combustible producido con DMC y aceites vegetales o grasas como materias primas, debe ser considerado como un combustible alternativo, totalmente derivado de recursos renovables. Así, el carbonato de dimetilo funciona como un aceptor de acilo alternativo, que es ambientalmente neutro, barato, y no tóxico. El proceso de síntesis de este biocombustible similar al biodiésel es irreversible porque el compuesto intermedio (monoacil éster del ácido carbónico) inmediatamente se descompone en dióxido de carbono y un alcohol (Adamczak et al., 2009). Se ha descrito la utilización de varios catalizadores básicos, como KOH, metilato de sodio, hidruro de sodio o algunas aminas (Fabbri, Bevoni, Notari, & Rivetti, 2007; Islam, Kurle, Gossage, & Benson, 2013; Kurle, Islam, & Benson, 2013; Panchal, Dhoot, Deshmukh, Sharma, & Kachole, 2013).

La reacción de interesterificación entre triglicéridos y carbonato de dimetilo, DMC, produce una mezcla de FAMEs y ésteres cíclicos de carbonato de glicerol de

1. INTRODUCCIÓN

ácidos grasos ("Fatty Acid Glycerol Carbonate Esters" FAGCEs), que constituyen un nuevo tipo de biodiésel (Fabbri et al., 2007) patentado como DMC-BIOD. También se obtiene en esta mezcla una cantidad variable de carbonato de glicerina (GC) como se indica en la **Figura 1.22**. El nombre de carbonato de glicerina se emplea para denominar de forma simplificada al compuesto 4-hidroximetil-2-oxo-1,3-dioxolano, y dicarbonato de glicerina para referirse al ácido 4- (metoxicarboniloximetilo)-1,3-dioxolan-2-ona, que también se obtiene en el proceso de interesterificación.

Estas mezclas, que contienen moléculas derivadas de la glicerina, presentan propiedades físico-químicas adecuadas para ser empleadas como un nuevo tipo de biocombustible, actualmente patentados (Y. Li et al., 2005), con el que también se mejora la eficiencia atómica, ya que el número total de átomos que participan en la reacción, aunque no hayan reaccionado, forman parte de la mezcla final aplicada como biocombustible.

Dado que el DMC es un reactivo muy interesante, desde el punto de vista de la Química Verde, debido a su inocuidad (Y. Li et al., 2005) hay un elevado número de investigaciones tendentes a optimizar el nuevo biocombustibles DMC-BioD[®] operando en muy diferentes condiciones para conseguir la transesterificación. Así, se han evaluado no sólo diferentes catalizadores alcalinos (Fabbri et al., 2007; Islam et al., 2013; Kurle et al., 2013; Panchal et al., 2013), sino que también se han estudiado condiciones supercríticas (Ilham & Saka, 2009, 2010, 2012) o el empleo de diferentes lipasas (Min & Lee, 2011; Su, Du, Gong, & Wang, 2011; Su, You, & Wei, 2009; S. Sun, Zhang, Meng, & Xin, 2013; Yingying Wang & Cao, 2011; K.-P. Zhang et al., 2011; L. Zhang, Sun, Xin, Sheng, & Liu, 2010).

1. INTRODUCCIÓN

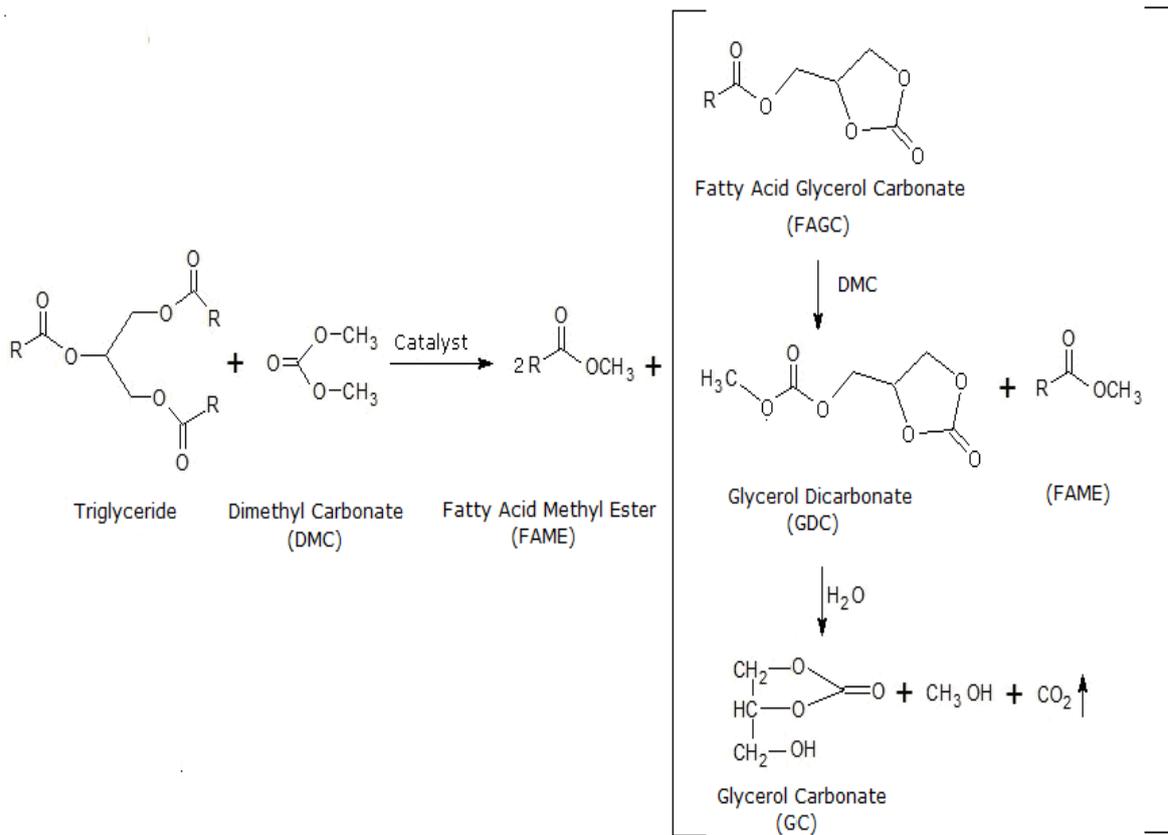


Figura 1.22. El DMC-BioD® es un nuevo tipo de biodiésel patentado por Polimeri Europa (Italia), que se obtiene por reacción de aceites con carbonato de dimetilo (DMC) en condiciones alcalinas, lo que evita la co-producción de glicerina mediante la obtención de una mezcla de dos moles de FAME y un mol de ácido graso de glicerol carbonato (FAGC). Este último puede experimentar, en una extensión variable, una descomposición que genera de esta manera dicarbonato y carbonato de glicerina (GDC) y (GC) respectivamente.

La principal diferencia entre el biocombustibles DMC-BIOD y el biodiésel convencional, producido a partir de aceite vegetal y metanol, es la presencia de monoésteres de ácidos grasos de carbonato de glicerol (FAGCs), además de los FAMES que constituyen el biodiésel convencional. Por esto, se han estudiado con cierto detalle la composición y las propiedades físicas y reológicas del DMC-BIOD, relevantes

1. INTRODUCCIÓN

para su uso como combustible (Fabbri et al., 2007). En ellos se concluye que, la presencia de FAGCs afecta ligeramente al comportamiento como combustible debido a que afecta las propiedades de flujo, al presentar valores de viscosidad algo más elevados.

En resumen, respecto a las ventajas e inconvenientes del DMC, como un reactivo alternativo para llevar a cabo la interesterificación de aceites y grasas, para producir biocombustibles a partir de recursos renovables y co-productos alternativos (carbonato de glicerol y dicarbonato de glicerol), se debe considerar que el DMC es un reactivo químico menos tóxico que el MeOH, que puede ser actualmente fabricado por métodos industriales ambientalmente seguros, a partir de CO₂ y recursos renovables. Además, es posible obtener muy importantes conversiones de triglicéridos mediante el uso de diferentes catalizadores básicos, lipasas, condiciones supercríticas etc., operando bajo condiciones relativamente suaves. También es importante considerar que el proceso de fabricación es muy simple, respecto al biodiésel convencional, ya que el exceso de DMC que no ha reaccionado, no necesita ser separado de los productos de reacción, debido a que es un aditivo eficaz para motores diésel, con un alto contenido en oxígeno (Rounce, Tsolakis, Leung, & York, 2010).

En este sentido, mientras que en el proceso de metanolisis todo la glicerina se obtiene como co-producto, en la reacción con DMC una gran parte de esta glicerina (puede ser > 65%) se incorpora en el biocombustible en forma de FAGCs y la fracción restante se convierte en carbonato y dicarbonato de glicerina (Y. Li et al., 2005). Esta opción es por tanto más rentable que un proceso en dos pasos, donde la glicerina obtenida como subproducto en el proceso de transesterificación convencional se transforma, en un segundo paso, en carbonato y dicarbonato de glicerol (J. Li & Wang, 2010; Ochoa-Gomez et al., 2009). Así, estos compuestos obtenidos simultáneamente con los FAMES pueden encontrar una mejor utilización como

1. INTRODUCCIÓN

aditivos, y su introducción en el mercado contribuiría a mitigar el problema de la sobreproducción de glicerina debido a la creciente fabricación de biodiésel convencional.

Finalmente, se puede concluir que la presencia de FAGCs en la mezcla de reacción DMC-BIOD tiene algunos efectos perjudiciales sobre las propiedades de flujo (valores de viscosidad) con respecto al biodiésel convencional (FAME puro); por lo que su uso como B100, pura, en los motores actuales de inyección directa no es aconsejable. Sin embargo, el uso de DMC-BIOD como aditivo del diésel fósil (por ejemplo, en el típico B20, 20/80 relación de biodiésel/diésel) parece ser muy adecuada para los actuales motores diésel. Los experimentos de pirólisis indican que el biodiésel es menos propenso a emitir hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) que el diésel de origen fósil. La presencia de componentes más oxigenados (es decir FAGCs) en DMC-BIOD no debe afectar negativamente, sino todo lo contrario, los niveles de emisión de HAP del biodiésel convencional.

1.7.3. BIOCOMBUSTIBLES QUE INTEGRAN EL GLICEROL EN FORMA DE MONOGLICÉRIDOS.

En este sentido, se ha desarrollado una metodología que permite la preparación de un nuevo tipo de biodiésel que integra la glicerina en forma de monoglicéridos (MG), mediante transesterificación enzimática 1,3-regioespecífica del aceite de girasol, usando lipasa pancreática del cerdo (PPL), en forma libre (Caballero et al., 2009; C. Verdugo et al., 2010) e inmovilizada (C. Luna et al., 2013; D. Luna et al., 2012). Además, se obtiene que las condiciones de funcionamiento del proceso enzimático, en comparación con el método de preparación de biodiésel convencional, sean mucho más suave y sin generación de impurezas (ácidas o alcalinas), que necesiten de un proceso de purificación adicional.

Así, el Ecodiésel-100 (Caballero et al., 2009; C. Luna et al., 2013; D. Luna et al., 2012; C. Verdugo et al., 2010) ya patentado, es un biocombustibles obtenido a través de la etanólisis parcial 1,3-selectiva de los triglicéridos con lipasas (PPL o microbianas), constituido por una mezcla de dos partes de FAEEs y una parte de MG, que integra por tanto la glicerina como MG, producto derivado de la glicerina, que es soluble en el combustible diésel. En este procedimiento, a diferencia de los métodos anteriormente descritos, no se utiliza un reactivo específico (tal como carbonato de dimetilo o acetato de metilo) más caro que el etanol, que es el único reactivo aquí empleado. De hecho, la propia estereoquímica del proceso prevé un consumo menor de este alcohol, aproximadamente el consumo de alcohol se debe reducir en 1/3, aproximadamente. El procedimiento aprovecha el carácter 1,3 selectivo de las lipasas, lo que permite "detener" el proceso en el segundo paso de la alcoholisis, obteniendo así una mezcla de dos moles de FAEE y uno de MG, como productos del proceso, como se muestra en la **Figura 1.23**.

1. INTRODUCCIÓN

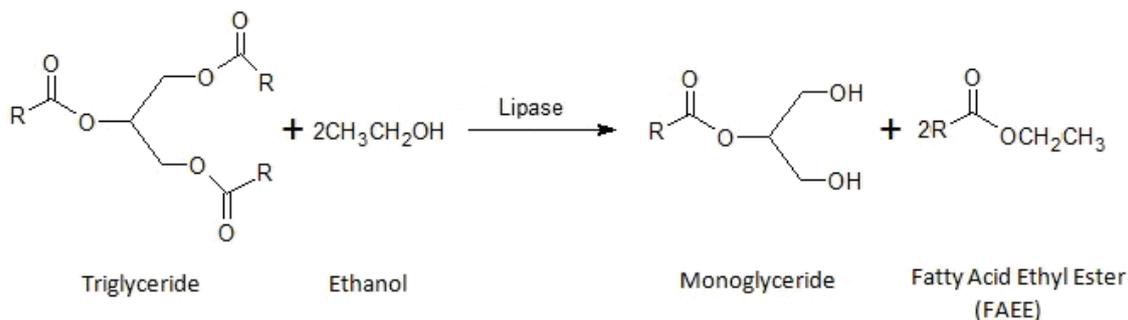


Figura 1.23. El Ecodiésel-100®, es un biocombustible obtenido por tecnología enzimática y patentado por la Universidad de Córdoba, que incorpora la glicerina en forma de monoglicéridos, estando formado por dos moles de los ésteres etílicos de los ácidos grasos (FAEE) y un mol de monoglicéridos (MG).

De esta forma, aprovechando la capacidad de las lipasas, pues son 1,3 selectivas, para realizar una alcoholisis incompleta, se obtiene una serie de monoglicéridos, lo que evita la producción de glicerol como subproducto, reduciendo así el impacto medioambiental del proceso.

En comparación con el método convencional, las condiciones de operación en los procesos enzimáticos son mucho más suaves, no hay impurezas que deban eliminarse de la mezcla final y el biocombustible obtenido presenta unas propiedades fisicoquímicas similares a las del biodiésel convencional. Además, como se ha demostrado en estudios específicos recientes (Haseeb, Sia, Fazal, & Masjuki, 2010; Wadumesthrige, Ara, Salley, & Ng, 2009; Xu, Wang, Hu, Li, & Zhu, 2010) los monoacilglicéridos (MG) mejoran la lubricidad del biodiésel.

Remarcar también, que el etanol que no se agota en el proceso enzimático, y permanece en la mezcla de reacción, al igual que se ha descrito en los dos procesos basados en el acetato o carbonato de metilo, no necesita ser separado, de tal manera que después de la reacción, la mezcla de productos obtenida se puede utilizar directamente como combustible. En este sentido, algunos estudios (Cheenkachorn &

1. INTRODUCCIÓN

Fungtammasan, 2009; I, 2011) han demostrado que las mezclas triples de combustible diésel y etanol con biodiésel han producido un leve descenso en la potencia máxima respecto al diésel convencional, pero mejoran el comportamiento general del biocombustible en ambientes fríos. Aunque, no se observó ninguna diferencia significativa en las emisiones de CO₂, CO, NO_x entre el diésel y las mezclas triples de diésel, biodiésel y etanol, el uso de estas mezclas promueve una importante reducción en la emisión de partículas contaminantes.

En consecuencia, de acuerdo con los estudios citados y teniendo en cuenta los efectos limitados obtenidos, respecto a la utilización de diésel puro, dichas mezclas triples se pueden utilizar en motores diésel convencionales, sin ninguna modificación. De hecho, la expresión Ecodiésel se atribuye actualmente a cualquier mezcla de ésteres alquílicos de ácidos grasos con etanol, sólo o con cualquier proporción de combustible diésel (Cheenkachorn & Fungtammasan, 2009; I, 2011; Jaganjac et al., 2012; Pang, Mu, Yuan, & He, 2008).

Por otro parte, el uso de biodiésel convencional como un aditivo del combustible diésel fósil para mejorar sus propiedades lubricantes está aumentando rápidamente. No obstante, a pesar de que la mayor parte de las propiedades del biodiésel son comparables con las del combustible diésel de origen fósil, el peor comportamiento de las propiedades de flujo a bajas temperaturas sigue siendo uno de los principales problemas al utilizar biodiésel puro como combustible alternativo para motores diésel. Ello hace que por el momento se recomiende el uso de diferentes mezclas diésel/biodiésel, reconocidas como B20 etc., como el método más sencillo de evitar la importante desventaja del biodiésel convencional en climas fríos, que puede comprometer su viabilidad comercial durante todo el año en territorios que sufren grandes periodos de tiempo con bajas temperaturas. Así, se ha demostrado que los ésteres metílicos de ácidos grasos de aceite de soja (FAMES) presentan problemas de

1. INTRODUCCIÓN

operatividad a temperatura ambiente próximas a los 0 °C. Con el diésel convencional también se manifiestan problemas similares pero a temperaturas significativamente más bajas, típicamente entre -16 y -20 °C.

Sin embargo, se ha comprobado que el etanol es un buen aditivo capaz de obtener una reducción considerable en el punto de fluidez (“pour point”) (Bhale, Deshpande, & Thombre, 2009), lo que pone de manifiesto la idoneidad del etanol como co-aditivo para mejorar las propiedades de flujo en frío de las mezclas triples diésel/biodiésel/etanol. De forma que estas mezclas triples mejoran tanto el comportamiento del motor en ambientes fríos como la calidad de las emisiones.

De esta forma, las mezclas etanol/biodiésel constituyen un biocombustible alternativo totalmente renovable, económicamente viable tanto para mejorar el comportamiento del flujo en frío (viscosidad) como para mejorar las características de las emisiones, sin afectar el rendimiento del motor. Es por ello que estas mezclas triples están recibiendo una atención creciente por sus ventajas económicas y ambientales, dado que las mezclas de bioetanol/biodiésel con combustibles diésel (mezclas triples) constituyen una alternativa que permite incorporar una fracción importante de productos renovables en los combustibles para vehículos operados por motores diésel convencionales (Lapuerta, Garcia-Contreras, & Agudelo, 2010).

A este respecto, cabe esperar que el Ecodiésel pudiese mostrar un leve aumento en las propiedades de fluidez (viscosidad) y en los puntos de enturbiamiento (cloud points) que el biodiésel convencional; sin embargo, la presencia de etanol como parte de un reactivo excedente de la reacción de etanolisis, compensará con creces las elevaciones de las propiedades características a bajas temperatura debidas a la presencia de los MGs del Ecodiésel. Además, hay descritos diversos aditivos que se pueden utilizar para mantener las funciones químicas básicas, para mejorar la ignición,

1. INTRODUCCIÓN

la eficiencia de la combustión y la estabilización de tales mezclas de combustibles (N. M. Ribeiro et al., 2007).

Otro obstáculo significativo para la aceptación comercial del biodiésel convencional es su mayor capacidad de obstrucción de los filtros, debido a la generación de precipitados en el biocombustible. La mayoría de estos precipitados se pueden atribuir a la presencia de estearil glucósidos (SGS) o a estearil monoacilgliceroles en el biodiésel (Tang, De Guzman, Salley, & Ng, 2010; Tang, Salley, & Ng, 2008). Por tanto, los monoacilgliceroles (MG) de ácidos grasos saturados desempeñan una importante influencia en las propiedades de flujo en frío del biodiésel, a través de los efectos en el punto de enturbiamiento (CP), punto de congelación (FP), punto de obstrucción del filtro frío (CFPP), y el punto de aparición de ceras (WAP).

Estos MG saturados también presentan baja solubilidad en el biodiésel, por lo que también pueden formar residuos sólidos durante el almacenamiento en frío, por lo que las monoleínas puras pueden ser problemáticas con respecto a las transiciones que funden entre 25 y 33 °C, sin embargo los datos de solubilidad de mezclas FAME/MG presentan un amplio rango de temperaturas de transición de sólido a líquido a bajas temperaturas. Es por ello que altas cantidades de MG son capaces de generar aumentos en los parámetros característicos de los biocombustibles en frío, como son CP, FP y CFPP .

Además, se obtuvo que la formación de precipitados durante el almacenamiento a bajas temperaturas era muy dependiente, no sólo de la concentración de estos compuestos en la mezcla, sino también de la materia prima empleada para la fabricación del biodiésel. Así, en un biodiésel obtenido a partir de aceite de soja, los estearil glucósidos son la causa principal de la formación de

1. INTRODUCCIÓN

precipitado, mientras que para un biodiésel obtenido a partir de grasas de aves de corral, los precipitados se deben principalmente a los monoglicéridos saturados presentes. En otros casos, los precipitados producidos en el biodiésel obtenido a partir de aceite de semilla de algodón, se deben a ambos tipos de compuestos, estearil glucósidos y monoglicéridos, respectivamente (Tang et al., 2008). A este respecto, se está investigando una prueba o test para medir la capacidad de oclusión de los filtros en frío que permita identificar los combustibles que puedan tener una propensión a obstruir los filtros cuando se exponen a largos plazos de almacenamiento a bajas temperaturas (Dunn, 2009).

Por otra parte, estudios recientes han demostrado que las muestras de biodiésel con pobres propiedades de flujo en frío se mejoraron notablemente, para uso práctico en climas de temperaturas del orden $+ 0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, mediante la mezcla con otras muestras de biodiésel que presentan mejores propiedades de flujo en frío. Sin embargo, la previa eliminación de los componentes minoritarios, tales como glucósidos de estearilo y monoglicéridos no mejoró las propiedades de CFPP (Echim, Maes, & De Greyt, 2012).

En consecuencia, el Ecodiésel podría tener unas limitaciones muy ligeramente superiores que el biodiésel convencional cuando se opera a bajas temperaturas, pero esta desventaja podría ser resuelta utilizando mezclas adecuadas de mezclas triples diésel/ biodiésel/ etanol. En este sentido, esta metodología debe ser diseñada teniendo en cuenta específicamente el tipo de aceite usado como materia prima, así como las condiciones climáticas donde se utilizará el biocombustible.

1.8. FUTURAS PERSPECTIVAS EN LA PRODUCCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES.

1.8.1. RETOS FUTUROS PARA EL DESARROLLO DE LOS BIOCOMBUSTIBLES.

Con la disminución de la disponibilidad de los recursos petroleros, el creciente deterioro del medio ambiente y la creciente demanda de combustibles por las economías emergentes, es imperativo desarrollar nuevas rutas para producir combustibles renovables para sustituir los combustibles fósiles convencionales. El uso de combustibles fósiles es insostenible a medio plazo debido al agotamiento de los recursos, así como a la acumulación de las emisiones de gases de efecto invernadero, debido al imparable consumo de energía fósil, por lo que se ha convertido en una importante prioridad desarrollar técnicas que permitan la reducción del consumo de combustibles fósiles y adoptar políticas que promuevan esas fuentes de energía renovables.

Los biocombustibles son una alternativa atractiva para los actuales combustibles basados en el petróleo, ya que permiten la sustitución del diésel fósil en los motores sin efectuar modificación alguna, mostrando también un perfil favorable en los gases emitidos en la combustión, ya que producen mucho menos monóxido de carbono, dióxido de azufre e hidrocarburos no quemados, que el combustible fósil. Por ello, los biocombustibles podrían desempeñar un papel esencial para reemplazar los actuales combustibles derivados del petróleo ya que al poder efectuar la sustitución directa de

1. INTRODUCCIÓN

los mismos, se pueden integrar fácilmente a los sistemas logísticos que están operando en la actualidad en el aprovisionamiento del sistema mundial de transporte.

Es verdad que en el escenario energético actual, la sustitución completa de los combustibles derivados del petróleo por biocombustibles es prácticamente imposible desde los puntos de vista de la capacidad de producción de la materia prima y de las posibilidades económicas, dada la actual brecha entre los precios. Pero la inseguridad energética y el cambio climático son las dos principales fuerzas motrices para el desarrollo de biocombustibles en todo el mundo, lo que también supone un gran potencial para estimular la agroindustria. Por tanto, es una urgente prioridad proceder a la introducción paulatina de combustibles basados en materias primas renovables.

Este proceso debería comenzar tan pronto como fuese posible, pero de forma suave y gradual, implementando la producción de los biocombustibles similares a los actualmente en el transporte, teniendo en cuenta su carácter renovable y evitando cambios bruscos en los precios del mercado, lo que podrían activar crisis energéticas no deseadas.

Sin embargo, la opción tecnológica, para la producción masiva de biocombustibles que permitan la sustitución de combustibles fósiles, probablemente no pueda ser el biodiésel convencional descrito por la norma EN14214, debido a las importantes desventajas expuestas anteriormente, asociadas a la producción de glicerina como subproducto, que obliga a un exhaustivo proceso de limpieza del biodiésel y a la predecible producción de una enorme cantidad de glicerina de difícil gestión.

De hecho, se supone que el actual retraso en la introducción de los biocombustibles está asociado con la dificultad de obtener biodiésel de acuerdo con la norma EN 14214, con la que se contempla el biodiésel estándar como mezclas de FAME, con estrictos límites en el contenido de glicerina.

1. INTRODUCCIÓN

Esto es debido a que, en este momento no sólo no está resuelto satisfactoriamente el problema de la limpieza de la glicerina, sino que aún no se dispone de las tecnologías adecuadas para la transformación de las ingentes cantidades de glicerina que se obtendrían en productos rentables. Además, en la actualidad no existe una tecnología definitiva para la limpieza de la glicerina residual que contamina el FAME, que sea económicamente viable y capaz de evitar el gasto de grandes cantidades de agua, tiempo y energía como en los procesos actualmente empleados.

Estos problemas son de suficiente entidad como para asumir que la sustitución de los combustibles fósiles por otros de carácter renovable pueda llevarse a cabo en el próximo futuro empleando el biodiésel convencional, a pesar de su fácil utilización, desde el punto de vista de la ingeniería del motor, ya que permite su empleo sin modificación alguna, en cualquier proporción. Por tanto, cobra una importancia creciente considerar de forma comparativa, aquellas metodologías alternativas actualmente disponibles, en diferentes etapas de desarrollo, capaces de producir biocombustibles adecuados para la sustitución de diésel fósil sin generación de glicerina (Calero et al., 2015; D. Luna et al., 2014).

En la **Tabla 1.8** se muestra un resumen de los pros y contras de las diferentes metodologías existentes para la obtención de biocombustibles sin generar glicerina en el proceso (Calero et al., 2015).

1. INTRODUCCIÓN

Tabla 1.8. Esquema comparativo de las principales características de las diferentes tecnologías disponibles para producir combustibles líquidos renovables, a partir de aceites vegetales.

Type	Biodiesel EN 14214	Petrodiesel-like biofuels	Biodiesel-like biofuels		
			Gliperol®	DMC-Biod®	Ecodiesel®
Name	Biodiesel	Green diesel	Gliperol®	DMC-Biod®	Ecodiesel®
Reactive	Methanol or Ethanol	H ₂	Methyl acetate	Methyl carbonate	Ethanol
Catalyst	NaOH or KOH	hydrotreating Ni-Mo type	Acid, Basic or Lipases	Basic or Lipases	Lipases
Products	3 FAME or 3 FAEE	Hydrocarbons C7-C18	glycerol triacetate + 3 FAME	Fatty acid Glycerol Carbonate + 2 FAME	Monoglycerides + 2 FAEE
Byproducts	Glycerol	CO, CO ₂ , O ₂ , N ₂ , H ₂ S, and C1-C6 hydrocarbons	no waste	no waste	no waste
separation process & cleaning	Complex	simple	not needed	not needed	not needed
Investment facilities	Medium	High, if the hydroprocessing facilities are not available.	Low	Low	Low
Free fatty acids and/or water in the starting oil	Free fatty acids are transformed to soaps.	Free fatty acids are transformed to biofuel	Free fatty acids are transformed to biofuel	Free fatty acids are transformed to biofuel	Free fatty acids are transformed to biofuel
Catalyst cost	Low	Medium	High	High	High
Environmental impact	High. Alkaline and saline effluents are generated. Wastewater treatment is needed.	Low	Low	Low	Low

1. INTRODUCCIÓN

De las alternativas disponibles, se puede destacar que el diésel "verde", o renovable ("green diesel") obtenido mediante el hidro-procesamiento de aceites y grasas en las actuales instalaciones de las refinerías de petróleo, destinadas a la reducción de su contenido en azufre, puede ser una tecnología viable económicamente, ya que además de contar con las instalaciones adecuadas ya construidas en las refinerías de petróleo convencionales, se dispone del hidrógeno necesario para el procesado, que se obtiene de forma abundante en las mismas plantas petroquímicas. Las parafinas obtenidas en el hidroprocesamiento de aceites o grasas, son compuestos de alta calidad, disponibles de forma inmediata para su distribución mediante el sistema logístico actual, dado que todos los productos de reacción son compuestos que se encuentran en los productos de refinería normales y no requieren ninguna manipulación especial, de modo que pueden ser fácilmente mezclados con productos de refinería convencionales en cualquier proporción.

Por tanto, teniendo en cuenta el elevado grado de madurez del procedimiento para obtener biocombustibles similares al diésel por hidrotratamiento de aceites y grasas, en las instalaciones de las refinerías convencionales de hidrotratamiento, utilizadas actualmente para reducir el azufre presente en los combustibles fósiles, habría que considerar la conveniencia de aplicar una revisión del marco legal que incentive a las empresas petroleras el incorporar cantidades crecientes de aceites y grasas renovables, en su proceso de refinado del petróleo convencional, para cumplir los porcentajes de sustitución previstos, en aquellos países comprometidos por los tratados internacionales en la sustitución de combustibles fósiles por materias primas renovables.

Por otro lado, según puede verse en la **Tabla 1.8**, en la actualidad hay algunas otras metodologías, en fase de desarrollo, que pueden producir biocombustibles similares al biodiésel, que evitan la generación de glicerol, de modo que, al

1. INTRODUCCIÓN

incorporarlo como un derivado que forma parte del biocombustible, presentan 100% de eficiencia atómica. Además, este tipo de biocombustibles similares al biodiésel presentan propiedades lubricantes superiores tanto a los combustibles fósiles como incluso al biodiésel convencional. El mayor contenido de oxígeno, con respecto al diésel de petróleo también asegura una combustión más completa con emisiones con un menor contenido de CO, de hidrocarburos libres y de emisión de partículas.

Al mismo tiempo, estas tecnologías que integran la glicerina como un derivado (triacetato de glicerol, ésteres de ácidos grasos del carbonato de glicerol o simplemente como monoglicéridos), también pueden aplicarse de forma rentable a la fabricación de biocombustibles a muy pequeña escala y con una inversión mínima, en comparación con las plantas de producción de biodiésel convencional o con las refinerías de petróleo actuales. Esto permitiría su instalación en zonas cercanas a donde se producen los cultivos de oleaginosas (la planta de biocombustible se convertiría realmente en un tratamiento adicional posterior a la extracción del aceite de los cultivos), esto probablemente permitiría que estas tecnologías fuesen aun claramente más competitivas que la tecnología de hidrotreatmento para la producción de biocombustibles, ya que éstas presentan 100% de eficiencia atómica, mientras que el hidrotreatmento elimina la glicerina en forma de CO₂. Además, se evitarían los costes logísticos del transporte de áreas geográficas dispersas, a las plantas de gran producción, donde deben recogerse grandes cantidades de las materias primas necesarias.

A este respecto, la simplicidad de los procesos de producción de biocombustibles similares al biodiésel convencional, por interesterificación de aceites vegetales con acetato de metilo o carbonato de metilo, usados como aceptores de acilo (como se muestra en la **Figura 1.24**), así como los obtenidos por etanolisis selectiva de aceites vegetales utilizando lipasas como biocatalizadores, (**Figura 1.25**) se

1. INTRODUCCIÓN

puede contrastar, al compararlos con el proceso de producción de biodiésel convencional, obtenido por reacciones catalizadas en medio básico, como se recoge en la **Figura 1.5**.

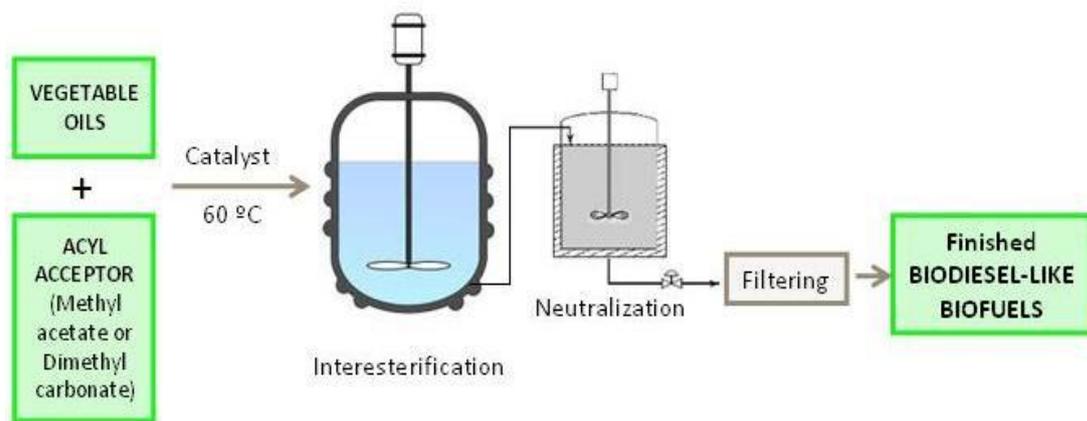


Figura 1.24. Proceso de producción de los biocombustibles similares al biodiésel por interesterificación de aceites vegetales con acetato de metilo o carbonato de metilo, que se utilizan como receptores de acilo.

El desarrollo y la maduración de estas tecnologías, que producen biocombustibles similares al biodiésel, aplicables a motores diésel, pero sin generar glicerina como subproducto de la reacción, evitando de esta manera la necesidad de cualquier proceso de limpieza del biocombustible producido, con el consiguiente costo adicional en agua y energía y la gestión de la glicerina producida. Es de esperar que estas nuevas metodologías permitan impulsar el uso de los biocombustibles, para crear un escenario de oportunidades para pequeñas y medianas empresas para la producción de biocombustibles en muy diversas áreas geográficas, en las que sea posible el cultivo de plantas adecuadas para su transformación "in situ" en biocombustibles. De esta forma, la agricultura podrá desempeñar un papel cada vez

1. INTRODUCCIÓN

más importante, a través de la producción de nuevos cultivos capaces de suministrar a los sectores industriales y energéticos que ahora son completamente dependientes del petróleo.

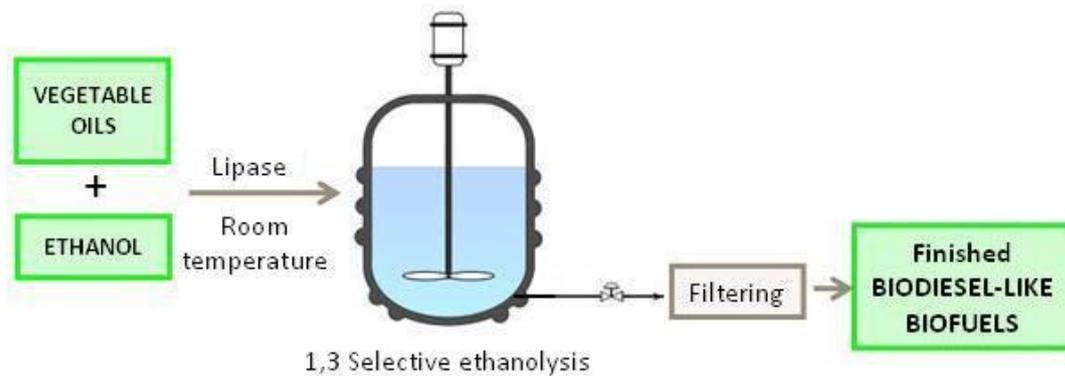


Figura 1.25, Proceso de producción de los biocombustibles similares al biodiésel (Eccodiésel) por etanolisis selectiva de aceites vegetales utilizando lipasas como biocatalizador.

Del mismo modo, los residuos forestales, de la agricultura, la pesca y la ganadería podrían ser valorizados mediante su transformación en biocombustibles, aportando un importante valor añadido a las pequeñas y medianas empresas del sector. De este modo, los distintos países, en función de sus posibilidades de desarrollo podrían impulsar aquellos procedimientos más adecuados a sus circunstancias, para avanzar en un proceso estable y continuado de sustitución de los combustibles fósiles, por aquellas materias primas renovables más accesibles, en cada territorio.

En consecuencia, parece ser una prioridad la modificación del marco legal en aquellos países decididos a llevar a cabo una sustitución gradual y sostenida de los combustibles fósiles, con el objetivo declarado de promover el uso de estos nuevos

1. INTRODUCCIÓN

biocombustibles, para que puedan tener la oportunidad de jugar el papel inicialmente asignado en exclusiva al biodiésel convencional, según la norma EN 14214. Sería de esperar que en este nuevo escenario legal se generen oportunidades para el establecimiento de empresas de base tecnológica, en las que se lleve a cabo la maduración de estas tecnologías para obtener en el corto/medio plazo un aumento gradual de los niveles de producción, para llegar en el largo plazo a la sustitución total en el uso de combustibles fósiles, evitando de esta manera el riesgo de una crisis energética no deseada.

1.8.2. PERSPECTIVAS FUTURAS EN EL DESARROLLO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA, NECESARIA PARA IMPLEMENTAR LA PRODUCCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES.

A pesar de los logros conseguidos en los últimos años en la producción de biocombustibles renovables, capaces de sustituir al diésel fósil en los motores convencionales, es necesario aún resolver una serie de cuestiones para conseguir el objetivo de posibilitar el reemplazo de los combustibles fósiles de forma rentable y segura. Así, el grado de madurez de los procesos que permiten obtener “diésel verde” en las refinerías convencionales es bastante elevado, lo que no impide que sigan desarrollándose investigaciones en este campo, sobre todo abordando fuentes no convencionales de triglicéridos capaces de proporcionar diésel renovable (Rana et al., 2013) sin generar glicerol como subproducto. En general, esta tecnología hoy por hoy es insustituible para el tratamiento de mezclas de triglicéridos con elevadas concentraciones de ácidos grasos libres ya que estos materiales al ser tratados en cualquier medio básico producen jabones.

1. INTRODUCCIÓN

Por otra parte, en el campo de los biocombustibles similares al biodiésel convencional, podemos establecer una clara diferencia entre los procesos de interesterificación con acetato de metilo, o carbonato de dimetilo (**Figura 1.30**), y los que se basan en la obtención de una etanolisis selectiva (**Figura 1.31**), ya que aunque en todos los casos se opera con un rendimiento o eficiencia atómica del proceso del 100 %, en los dos primeros casos se emplean reactivos de mayor precio, y que necesitan una mayor concentración de reactivo, que en el caso de la etanolisis selectiva, donde se emplea etanol como reactivo, en una concentración menor, ya que se pretende una etanolisis parcial.

Por tanto, las investigaciones tendentes a optimizar la utilización de lipasas, aprovechando su capacidad para obtener la alcoholisis 1,3 regioespecífica de los triglicéridos con alcoholes de cadena corta, puede constituir a medio plazo un procedimiento competitivo, respecto al convencional basado en la catálisis homogénea básica, en la obtención de nuevos biocarburantes aplicables en motores diésel. Así, la incorporación de la glicerina como monoglicérido no sólo reduce la complejidad del proceso, aumenta su rendimiento y reduce al mínimo la generación de residuos, sino que además, al ser un proceso enzimático, las reacciones se llevan a cabo en condiciones comparativas mucho más suaves (o "verdes") que las habitualmente empleadas para la producción de biodiésel (pH, temperatura, presión, etc.) en forma convencional.

Sin embargo, el elevado precio que presentan las enzimas en general, y por tanto las lipasas, limita de forma determinante su aplicación a escala industrial. Para paliar esta situación existe un consenso generalizado, que implica la utilización de lipasas de bajo coste y/o su fijación o inmovilización (heterogeneización) en cualquier tipo de soporte, compatible con el proceso al que se desee aplicar. En este sentido, en el Departamento de Química Orgánica de la UCO se viene desarrollando un proyecto

1. INTRODUCCIÓN

de investigación que pretende optimizar esta ruta enzimática, mediante la caracterización de lipasas microbianas capaces de realizar el proceso selectivo, tanto en forma libre (C. Luna, E. D. Sancho, et al., 2014; C. Luna, C. Verdugo, et al., 2014a), como inmovilizada (Calero, Verdugo, et al., 2014; C. Luna, C. Verdugo, et al., 2014b; C. Luna, C. Verdugo, et al., 2014c). Avanzando incluso en la obtención de lipasas procedentes de cepas silvestres, incluso más eficientes en este proceso (Escobar-Nino et al., 2014).

Para intentar solventar las actuales limitaciones existentes para el uso de lipasas industriales, debidas principalmente a sus altos costes, se ha iniciado también estudios para conseguir la etanolisis selectiva de triglicéridos por vía química. Así, de modo que a fin de lograr un incremento adicional en la viabilidad y competitividad respecto al proceso enzimático, recientemente se ha iniciado el estudio de la reacción de transesterificación parcial de los triglicéridos, a través del control cinético de la reacción química, para obtener los mismos resultados descritos en los procesos enzimáticos estereoselectivos. Estas investigaciones tienen como objetivo conseguir el mismo tipo de biodiésel, mediante el uso de catalizadores heterogéneos alcalinos como el KF soportado (Calero, Cumplido, et al., 2014) o el CaO (Calero, Luna, et al., 2014), como alternativas a las lipasas actualmente más caras.

Los catalizadores heterogéneos son más benignos que los homogéneos, pueden operar en procesos continuos y ser reutilizados. Pero su costo de síntesis es comparativamente mayor que los catalizadores alcalinos convencionales, NaOH o KOH. Por ellos, el CaO puede tener un interesante papel en la metanolisis de triglicéridos (Boey, Maniam, & Abd Hamid, 2011; Chouhan & Sarma, 2011). Sin embargo, a pesar del éxito de diversos catalizadores heterogéneos, actualmente no se consideran viables para su aplicación a escala industrial en la producción de biodiésel convencional, ya que la mayoría de estos catalizadores son caros. Además, se obtiene

1. INTRODUCCIÓN

siempre una marcada disminución en la actividad catalítica, en comparación con la catálisis homogénea, que requiere operar a presiones y temperaturas más elevadas y, con altas proporciones de aceite/metanol, por lo que hasta ahora no se ha considerado rentable su aplicación a escala industrial para la producción de biodiésel convencional (Viola et al., 2012).

La alternativa propuesta como objetivo investigador de la presente Tesis Doctoral va encaminada a implementar la producción eficiente, mediante catálisis enzimática de Ecodiésel, un biocombustible capaz de sustituir, total o parcialmente, al diésel fósil en los motores actuales, sin realizar modificación alguna en los mismos. Así, continuando las investigaciones en base a la metodología enzimática, patentada por la universidad de Córdoba, que evita la producción del glicerol, en el proceso de obtención del biocombustible, manteniéndolo en forma de monoglicérido, se ha realizado el trabajo experimental de la presente Tesis Doctoral.

El objetivo de estas investigaciones se ha dirigido a posibilitar la viabilidad técnica y económica de este proceso enzimático, mediante la evaluación de diversos biocatalizadores, constituidos tanto por diversas lipasas comerciales, en forma libre o inmovilizada, como por extractos enzimáticos lipásicos, obtenidos a partir de cultivos microbianos líquidos, obtenidos a partir de cepas comerciales o silvestres. Con esta propuesta de desarrollo biotecnológico se pretende fundamentalmente, reducir el elevado costo actualmente asociado a las tecnologías enzimáticas, por un lado, con la optimización del proceso de inmovilización, y por otro, avanzando en la obtención de extractos enzimáticos, con técnicas sencillas como liofilización y diálisis, que aunque no generan mezclas de proteínas muy purificadas, si cuentan con suficiente actividad lipásica, para posibilitar su reutilización y maximizando el rendimiento de dichos biocatalizadores.

1.9. REFERENCIAS

- Adamczak, M., Bornscheuer, U. T., & Bednarski, W. (2009). The application of biotechnological methods for the synthesis of biodiesel. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 111(8), 800-813. doi: 10.1002/ejlt.200900078
- Adhikari, S., Fernando, S. D., & Haryanto, A. (2009). Hydrogen production from glycerol: An update. *Energy Conversion and Management*, 50(10), 2600-2604. doi: 10.1016/j.enconman.2009.06.011
- Adhikari, S., Fernando, S. D., To, S. D. F., Bricka, R. M., Steele, P. H., & Haryanto, A. (2008). Conversion of glycerol to hydrogen via a steam reforming process over nickel catalysts. *Energy & Fuels*, 22(2), 1220-1226. doi: 10.1021/ef700520f
- Akiyama, M., Sato, S., Takahashi, R., Inui, K., & Yokota, M. (2009). Dehydration-hydrogenation of glycerol into 1,2-propanediol at ambient hydrogen pressure. *Applied Catalysis a- General*, 371(1-2), 60-66. doi: 10.1016/j.apcata.2009.09.029
- Al-Zuhair, S., Hussein, A., Al-Marzouqi, A. H., & Hashim, I. (2012). Continuous production of biodiesel from fat extracted from lamb meat in supercritical CO₂ media. *Biochemical Engineering Journal*, 60, 106-110. doi: 10.1016/j.bej.2011.10.010
- Alves, M. J., Nascimento, S. M., Pereira, I. G., Martins, M. I., Cardoso, V. L., & Reis, M. (2013). Biodiesel purification using micro and ultrafiltration membranes. *Renewable Energy*, 58, 15-20. doi: 10.1016/j.renene.2013.02.035
- Anitescu, G., & Bruno, T. J. (2012). Fluid properties needed in supercritical transesterification of triglyceride feedstocks to biodiesel fuels for efficient and clean combustion - A review. *Journal of Supercritical Fluids*, 63, 133-149. doi: 10.1016/j.supflu.2011.11.020
- Antonio Melero, J., Iglesias, J., & Garcia, A. (2012). Biomass as renewable feedstock in standard refinery units. Feasibility, opportunities and challenges. *Energy & Environmental Science*, 5(6), 7393-7420. doi: 10.1039/c2ee21231e
- Arbogast, S., Bellman, D., Paynter, J. D., & Wykowski, J. (2012). Advanced bio-fuels from pyrolysis oil: The impact of economies of scale and use of existing logistic and processing capabilities. *Fuel Processing Technology*, 104, 121-127. doi: 10.1016/j.fuproc.2012.04.036
- Atadashi, I. M., Aroua, M. K., & Aziz, A. A. (2010). High quality biodiesel and its diesel engine application: A review. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, 14(7), 1999-2008. doi: 10.1016/j.rser.2010.03.020
- Atadashi, I. M., Aroua, M. K., Aziz, A. R. A., & Sulaiman, N. M. N. (2012). The effects of water on biodiesel production and refining technologies: A review. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, 16(5), 3456-3470. doi: 10.1016/j.rser.2012.03.004
- Athalye, S. K., Garcia, R. A., & Wen, Z. (2009). Use of Biodiesel-Derived Crude Glycerol for Producing Eicosapentaenoic Acid (EPA) by the Fungus *Pythium irregulare*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(7), 2739-2744. doi: 10.1021/jf803922w

1. INTRODUCCIÓN

- Babtie, A., Tokuriki, N., & Hollfelder, F. (2010). What makes an enzyme promiscuous? *Current Opinion in Chemical Biology*, 14(2), 200-207. doi: 10.1016/j.cbpa.2009.11.028
- Bajaj, A., Lohan, P., Jha, P. N., & Mehrotra, R. (2010). Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: An overview. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 62(1), 9-14. doi: 10.1016/j.molcatb.2009.09.018
- Balaraju, M., Nikhitha, P., Jagadeeswaraiyah, K., Srilatha, K., Prasad, P. S. S., & Lingaiah, N. (2010). Acetylation of glycerol to synthesize bioadditives over niobic acid supported tungstophosphoric acid catalysts. *Fuel Processing Technology*, 91(2), 249-253. doi: 10.1016/j.fuproc.2009.10.005
- Ban, K., Hama, S., Nishizuka, K., Kaieda, M., Matsumoto, T., Kondo, A., . . . Fukuda, H. (2002). Repeated use of whole-cell biocatalysts immobilized within biomass support particles for biodiesel fuel production. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 17(3-5), 157-165. doi: 10.1016/s1381-1177(02)00023-1
- Bastida, A., Sabuquillo, P., Armisen, P., Fernandez-Lafuente, R., Huguet, J., & Guisan, J. M. (1998). Single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. *Biotechnology and Bioengineering*, 58(5), 486-493. doi: 10.1002/(sici)1097-0290(19980605)58:5<486::aid-bit4>3.0.co;2-9
- Behzadi, S., & Farid, M. M. (2009). Production of biodiesel using a continuous gas-liquid reactor. *Bioresource Technology*, 100(2), 683-689. doi: 10.1016/j.biortech.2008.06.037
- Berger, M., & Schneider, M. P. (1991). LIPASES IN ORGANIC-SOLVENTS - THE FATTY-ACID CHAIN-LENGTH PROFILE. *Biotechnology Letters*, 13(9), 641-645. doi: 10.1007/bf01086319
- Bezergianni, S., & Dimitriadis, A. (2013). Comparison between different types of renewable diesel. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, 21, 110-116. doi: 10.1016/j.rser.2012.12.042
- Bezergianni, S., Kalogianni, A., & Dimitriadis, A. (2012). Catalyst evaluation for waste cooking oil hydroprocessing. *Fuel*, 93(1), 638-641. doi: 10.1016/j.fuel.2011.08.053
- Bhale, P. V., Deshpande, N. V., & Thombre, S. B. (2009). Improving the low temperature properties of biodiesel fuel. *Renewable Energy*, 34(3), 794-800. doi: 10.1016/j.renene.2008.04.037
- Bjorkling, F., Godtfredsen, S. E., & Kirk, O. (1990). LIPASE-MEDIATED FORMATION OF PEROXYCARBOXYLIC ACIDS USED IN CATALYTIC EPOXIDATION OF ALKENES. *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications*(19), 1301-1303. doi: 10.1039/c39900001301
- Bloomer, S., Adlercreutz, P., & Mattiasson, B. (1990). TRIGLYCERIDE INTERESTERIFICATION BY LIPASES .1. COCOA BUTTER EQUIVALENTS FROM A FRACTION OF PALM OIL. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 67(8), 519-524. doi: 10.1007/bf02540759
- Boey, P.-L., Maniam, G. P., & Abd Hamid, S. (2011). Performance of calcium oxide as a heterogeneous catalyst in biodiesel production: A review. *Chemical Engineering Journal*, 168(1), 15-22. doi: 10.1016/j.cej.2011.01.009
- Borgdorf, R., & Warwel, S. (1999). Substrate selectivity of various lipases in the esterification of cis- and trans-9-octadecenoic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51(4), 480-485.

1. INTRODUCCIÓN

- Borges, M. E., & Diaz, L. (2012). Recent developments on heterogeneous catalysts for biodiesel production by oil esterification and transesterification reactions: A review. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, 16(5), 2839-2849. doi: 10.1016/j.rser.2012.01.071
- Bornscheuer, U. T. (1995). LIPASE-CATALYZED SYNTHESIS OF MONOACYLGLYCEROLS. *Enzyme and Microbial Technology*, 17(7), 578-586. doi: 10.1016/0141-0229(94)00096-a
- Bornscheuer, U. T. (2002). Methods to increase enantioselectivity of lipases and esterases. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(6), 543-547. doi: 10.1016/s0958-1669(02)00350-6
- Bradoo, S., Saxena, R. K., & Gupta, R. (1999). Partitioning and resolution of mixture of two lipases from *Bacillus stearothermophilus* SB-1 in aqueous two-phase system. *Process Biochemistry*, 35(1-2), 57-62. doi: 10.1016/s0032-9592(99)00032-1
- Brady, L., Brzozowski, A. M., Derewenda, Z. S., Dodson, E., Dodson, G., Tolley, S., . . . Menge, U. (1990). A SERINE PROTEASE TRIAD FORMS THE CATALYTIC CENTER OF A TRIACYLGLYCEROL LIPASE. *Nature*, 343(6260), 767-770. doi: 10.1038/343767a0
- Branneby, C., Carlqvist, P., Magnusson, A., Hult, K., Brinck, T., & Berglund, P. (2003). Carbon-carbon bonds by hydrolytic enzymes. *Journal of the American Chemical Society*, 125(4), 874-875. doi: 10.1021/ja028056b
- Brink, L. E. S., Tramper, J., Luyben, K., & Vantriet, K. (1988). BIOCATALYSIS IN ORGANIC MEDIA. *Enzyme and Microbial Technology*, 10(12), 736-743. doi: 10.1016/0141-0229(88)90118-4
- Busto, E., Gotor-Fernandez, V., & Gotor, V. (2010). Hydrolases: catalytically promiscuous enzymes for non-conventional reactions in organic synthesis. *Chemical Society Reviews*, 39(11), 4504-4523. doi: 10.1039/c003811c
- Caballero, V., Bautista, F. M., Campelo, J. M., Luna, D., Marinas, J. M., Romero, A. A., . . . Giordano, G. (2009). Sustainable preparation of a novel glycerol-free biofuel by using pig pancreatic lipase: Partial 1,3-regiospecific alcoholysis of sunflower oil. *Process Biochemistry*, 44(3), 334-342. doi: 10.1016/j.procbio.2008.11.015
- Calero, J., Cumplido, G., Luna, D., Sancho, E. D., Luna, C., Posadillo, A., . . . Verdugo-Escamilla, C. (2014). Production of a Biofuel that Keeps the Glycerol as a Monoglyceride by Using Supported KF as Heterogeneous Catalyst. *Energies*, 7(6), 3764-3780. doi: 10.3390/en7063764
- Calero, J., Luna, D., Sancho, E. D., Luna, C., Bautista, F. M., Romero, A. A., . . . Verdugo-Escamilla, C. (2015). An overview on glycerol-free processes for the production of renewable liquid biofuels, applicable in diesel engines. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, 42, 1437-1452. doi: 10.1016/j.rser.2014.11.007
- Calero, J., Luna, D., Sancho, E. D., Luna, C., Bautista, F. M., Romero, A. A., . . . Verdugo, C. (2014). Development of a new biodiesel that integrates glycerol, by using CaO as heterogeneous catalyst, in the partial methanolysis of sunflower oil. *Fuel*, 122, 94-102. doi: 10.1016/j.fuel.2014.01.033
- Calero, J., Verdugo, C., Luna, D., Sancho, E. D., Luna, C., Posadillo, A., . . . Romero, A. A. (2014). Selective ethanolysis of sunflower oil with Lipozyme RM IM, an immobilized *Rhizomucor miehei* lipase, to obtain a biodiesel-like biofuel, which avoids glycerol

1. INTRODUCCIÓN

- production through the monoglyceride formation *New Biotechnology*. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2014.02.008>
- Camacho, F., Robles, A., Gonzalez, P. A., Camacho, B., Esteban, L., & Molina, E. (2006). Mechanistic model for the lipase-catalyzed alcoholysis of triacylglycerols. *Applied Catalysis a-General*, *301*(2), 158-168. doi: 10.1016/j.apcata.2005.11.021
- Campanelli, P., Banchemo, M., & Manna, L. (2010). Synthesis of biodiesel from edible, non-edible and waste cooking oils via supercritical methyl acetate transesterification. *Fuel*, *89*(12), 3675-3682. doi: 10.1016/j.fuel.2010.07.033
- Capewell, A., Wendel, V., Bornscheuer, U., Meyer, H. H., & Scheper, T. (1996). Lipase-catalyzed kinetic resolution of 3-hydroxy esters in organic solvents and supercritical carbon dioxide. *Enzyme and Microbial Technology*, *19*(3), 181-186. doi: 10.1016/0141-0229(95)00229-4
- Carlos Serrano-Ruiz, J., Ramos-Fernandez, E. V., & Sepulveda-Escribano, A. (2012). From biodiesel and bioethanol to liquid hydrocarbon fuels: new hydrotreating and advanced microbial technologies. *Energy & Environmental Science*, *5*(2), 5638-5652. doi: 10.1039/c1ee02418c
- Carrasco-Lopez, C., Godoy, C., de las Rivas, B., Fernandez-Lorente, G., Palomo, J. M., Guisan, J. M., . . . Hermoso, J. A. (2009). Activation of Bacterial Thermoalkalophilic Lipases Is Spurred by Dramatic Structural Rearrangements. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(7), 4365-4372. doi: 10.1074/jbc.M808268200
- Carriere, F., Thirstrup, K., Hjorth, S., Ferrato, F., Nielsen, P. F., WithersMartinez, C., . . . Verger, R. (1997). Pancreatic lipase structure-function relationships by domain exchange. *Biochemistry*, *36*(1), 239-248. doi: 10.1021/bi961991p
- Casas, A., Jesus Ramos, M., & Perez, A. (2011). New trends in biodiesel production: Chemical interesterification of sunflower oil with methyl acetate. *Biomass & Bioenergy*, *35*(5), 1702-1709. doi: 10.1016/j.biombioe.2011.01.003
- Casas, A., Jesus Ramos, M., & Perez, A. (2012). Product Separation after Chemical Interesterification of Vegetable Oils with Methyl Acetate. Part II: Liquid-Liquid Equilibrium. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, *51*(30), 10201-10206. doi: 10.1021/ie300791g
- Casas, A., Jesus Ramos, M., & Perez, A. (2013). Methanol-enhanced chemical interesterification of sunflower oil with methyl acetate. *Fuel*, *106*, 869-872. doi: 10.1016/j.fuel.2012.11.037
- Casas, A., Ruiz, J. R., Ramos, M. J., & Perez, A. (2010). Effects of Triacetin on Biodiesel Quality. *Energy & Fuels*, *24*, 4481-4489. doi: 10.1021/ef100406b
- Celik, E., Ozbay, N., Oktar, N., & Calik, P. (2008). Use of biodiesel byproduct crude glycerol as the carbon source for fermentation processes by recombinant *Pichia pastoris*. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, *47*(9), 2985-2990. doi: 10.1021/ie071613o
- Chandrasekaran, S. M., & Wangikar, P. P. (2003). Method for lipase-catalyzed carbonate synthesis via one- and two-step alkoxycarbonylation reactions. *Biotechnology Progress*, *19*(2), 332-337. doi: 10.1021/bp025579e
- Cheenkachorn, K., & Fungtammasan, B. (2009). BIODIESEL AS AN ADDITIVE FOR DIESOHOL. *International Journal of Green Energy*, *6*(1), 57-72. doi: 10.1080/15435070802701819

1. INTRODUCCIÓN

- Chen, D., & Liu, C.-J. (2011). A Current Perspective on Catalysis for New Energy Technologies. *Chemcatchem*, 3(3), 423-425. doi: 10.1002/cctc.201100046
- Chen, H.-C., Ju, H.-Y., Wu, T.-T., Liu, Y.-C., Lee, C.-C., Chang, C., . . . Shieh, C.-J. (2011). Continuous Production of Lipase-Catalyzed Biodiesel in a Packed-Bed Reactor: Optimization and Enzyme Reuse Study. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*.
- Chen, Y., Xiao, B., Chang, J., Fu, Y., Lv, P., & Wang, X. (2009). Synthesis of biodiesel from waste cooking oil using immobilized lipase in fixed bed reactor. *Energy Conversion and Management*, 50(3), 668-673. doi: 10.1016/j.enconman.2008.10.011
- Chen, Y.-H., Huang, Y.-H., Lin, R.-H., & Shang, N.-C. (2010). A continuous-flow biodiesel production process using a rotating packed bed. *Bioresource Technology*, 101(2), 668-673. doi: 10.1016/j.biortech.2009.08.081
- Chopineau, J., McCafferty, F. D., Therisod, M., & Klibanov, A. M. (1988). PRODUCTION OF BIOSURFACTANTS FROM SUGAR ALCOHOLS AND VEGETABLE-OILS CATALYZED BY LIPASES IN A NONAQUEOUS MEDIUM. *Biotechnology and Bioengineering*, 31(3), 208-214. doi: 10.1002/bit.260310305
- Chouhan, A. P. S., & Sarma, A. K. (2011). Modern heterogeneous catalysts for biodiesel production: A comprehensive review. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, 15(9), 4378-4399. doi: 10.1016/j.rser.2011.07.112
- Contesini, F. J., Lopes, D. B., Macedo, G. A., Nascimento, M. d. G., & Carvalho, P. d. O. (2010). Aspergillus sp lipase: Potential biocatalyst for industrial use. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 67(3-4), 163-171. doi: 10.1016/j.molcatb.2010.07.021
- Corma, A., Huber, G. W., Sauvinaud, L., & O'Connor, P. (2007). Processing biomass-derived oxygenates in the oil refinery: Catalytic cracking (FCC) reaction pathways and role of catalyst. *Journal of Catalysis*, 247(2), 307-327. doi: 10.1016/j.jcat.2007.01.023
- Dalal, S., Singh, P. K., Raghava, S., Rawat, S., & Gupta, M. N. (2008). Purification and properties of the alkaline lipase from Burkholderia cepacia ATCC 25609. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 51, 23-31. doi: 10.1042/ba20070186
- Demirbas, A. (2006). Biodiesel production via non-catalytic SCF method and biodiesel fuel characteristics. *Energy Conversion and Management*, 47(15-16), 2271-2282. doi: 10.1016/j.enconman.2005.11.019
- Demirbas, A. (2008). Comparison of transesterification methods for production of biodiesel from vegetable oils and fats. *Energy Conversion and Management*, 49(1), 125-130. doi: 10.1016/j.enconman.2007.05.002
- Demirbas, A. (2009). Political, economic and environmental impacts of biofuels: A review. *Applied Energy*, 86, S108-S117. doi: 10.1016/j.apenergy.2009.04.036
- Derewenda, U., Brzozowski, A. M., Lawson, D. M., & Derewenda, Z. S. (1992). CATALYSIS AT THE INTERFACE - THE ANATOMY OF A CONFORMATIONAL CHANGE IN A TRIGLYCERIDE LIPASE. *Biochemistry*, 31(5), 1532-1541. doi: 10.1021/bi00120a034
- Dhar, A., Kevin, R., & Agarwal, A. K. (2012). Production of biodiesel from high-FFA neem oil and its performance, emission and combustion characterization in a single cylinder DIC engine. *Fuel Processing Technology*, 97, 118-129. doi: 10.1016/j.fuproc.2012.01.012
- Di Serio, M., Tesser, R., Pengmei, L., & Santacesaria, E. (2008). Heterogeneous catalysts for biodiesel production. *Energy & Fuels*, 22(1), 207-217. doi: 10.1021/ef700250g

1. INTRODUCCIÓN

- Dodson, G. G., Lawson, D. M., & Winkler, F. K. (1992). STRUCTURAL AND EVOLUTIONARY RELATIONSHIPS IN LIPASE MECHANISM AND ACTIVATION. *Faraday Discussions*, 93, 95-105. doi: 10.1039/fd9929300095
- Donnis, B., Egeberg, R. G., Blom, P., & Knudsen, K. G. (2009). Hydroprocessing of Bio-Oils and Oxygenates to Hydrocarbons. Understanding the Reaction Routes. *Topics in Catalysis*, 52(3), 229-240. doi: 10.1007/s11244-008-9159-z
- Du, W., Li, W., Sun, T., Chen, X., & Liu, D. (2008). Perspectives for biotechnological production of biodiesel and impacts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79(3), 331-337. doi: 10.1007/s00253-008-1448-8
- Du, W., Xu, Y. Y., Liu, D. H., & Li, Z. B. (2005). Study on acyl migration in immobilized lipozyme TL-catalyzed transesterification of soybean oil for biodiesel production. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 37(1-6), 68-71. doi: 10.1016/j.molcatb.2005.09.008
- Dunn, R. O. (2009). Effects of minor constituents on cold flow properties and performance of biodiesel. *Progress in Energy and Combustion Science*, 35(6), 481-489. doi: 10.1016/j.pecs.2009.07.002
- Echim, C., Maes, J., & De Greyt, W. (2012). Improvement of cold filter plugging point of biodiesel from alternative feedstocks. *Fuel*, 93(1), 642-648. doi: 10.1016/j.fuel.2011.11.036
- El Diwani, G., Attia, N. K., & Hawash, S. I. (2009). Development and evaluation of biodiesel fuel and by-products from jatropha oil. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 6(2), 219-224.
- Ericsson, D. J., Kasrayan, A., Johansson, P., Bergfors, T., Sandstrom, A. G., Backvall, J. E., & Mowbray, S. L. (2008). X-ray structure of *Candida antarctica* lipase a shows a novel lid structure and a likely mode of interfacial activation. *Journal of Molecular Biology*, 376(1), 109-119. doi: 10.1016/j.jmb.2007.10.079
- Escobar-Nino, A., Luna, C., Luna, D., Marcos, A. T., Canovas, D., & Mellado, E. (2014). Selection and Characterization of Biofuel-Producing Environmental Bacteria Isolated from Vegetable Oil-Rich Wastes. *Plos One*, 9(8). doi: 10.1371/journal.pone.0104063
- Fabbri, D., Bevoni, V., Notari, M., & Rivetti, F. (2007). Properties of a potential biofuel obtained from soybean oil by transmethylation with dimethyl carbonate. *Fuel*, 86(5-6), 690-697. doi: 10.1016/j.fuel.2006.09.003
- Fernandez, Y., Arenillas, A., Diez, M. A., Pis, J. J., & Menendez, J. A. (2009). Pyrolysis of glycerol over activated carbons for syngas production. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 84(2), 145-150. doi: 10.1016/j.jaap.2009.01.004
- Fernandez-Lafuente, R. (2010). Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 62(3-4), 197-212. doi: 10.1016/j.molcatb.2009.11.010
- Fernandez-Lafuente, R., Armisen, P., Sabuquillo, P., Fernandez-Lorente, G., & Guisan, J. M. (1998). Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. *Chemistry and Physics of Lipids*, 93(1-2), 185-197. doi: 10.1016/s0009-3084(98)00042-5

1. INTRODUCCIÓN

- Ferreira, P., Fonseca, I. M., Ramos, A. M., Vital, J., & Castanheiro, J. E. (2011). Acetylation of glycerol over heteropolyacids supported on activated carbon. *Catalysis Communications*, 12(7), 573-576. doi: 10.1016/j.catcom.2010.11.022
- Fjerbaek, L., Christensen, K. V., & Norddahl, B. (2009). A Review of the Current State of Biodiesel Production Using Enzymatic Transesterification. *Biotechnology and Bioengineering*, 102(5), 1298-1315. doi: 10.1002/bit.22256
- Fogassy, G., Thegarid, N., Toussaint, G., van Veen, A. C., Schuurman, Y., & Mirodatos, C. (2010). Biomass derived feedstock co-processing with vacuum gas oil for second-generation fuel production in FCC units. *Applied Catalysis B-Environmental*, 96(3-4), 476-485. doi: 10.1016/j.apcatb.2010.03.008
- Frusteri, F., Arena, F., Bonura, G., Cannilla, C., Spadaro, L., & Di Blasi, O. (2009). Catalytic etherification of glycerol by tert-butyl alcohol to produce oxygenated additives for diesel fuel. *Applied Catalysis a-General*, 367(1-2), 77-83. doi: 10.1016/j.apcata.2009.07.037
- Fukuda, H., Hama, S., Tamalampudi, S., & Noda, H. (2008). Whole-cell biocatalysts for biodiesel fuel production. *Trends in Biotechnology*, 26(12), 668-673. doi: 10.1016/j.tibtech.2008.08.001
- Fukuda, H., Kondo, A., & Noda, H. (2001). Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92(5), 405-416. doi: 10.1263/jbb.92.405
- Fureby, A. M., Adlercreutz, P., & Mattiasson, B. (1996). Glyceride synthesis in a solvent-free system. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 73(11), 1489-1495. doi: 10.1007/bf02523515
- Fureby, A. M., Virto, C., Adlercreutz, P., & Mattiasson, B. (1996). Acyl group migrations in 2-monoolein. *Biocatalysis and Biotransformation*, 14(2), 89-111. doi: 10.3109/10242429609106879
- Gandhi, N. N., Patil, N. S., Sawant, S. B., Joshi, J. B., Wangikar, P. P., & Mukesh, D. (2000). Lipase-catalyzed esterification. *Catalysis Reviews-Science and Engineering*, 42(4), 439-480. doi: 10.1081/cr-100101953
- Ghanem, A. (2007). Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds. *Tetrahedron*, 63(8), 1721-1754. doi: 10.1016/j.tet.2006.09.110
- Gog, A., Roman, M., Tosa, M., Paizs, C., & Irimie, F. D. (2012). Biodiesel production using enzymatic transesterification - Current state and perspectives. *Renewable Energy*, 39(1), 10-16. doi: 10.1016/j.renene.2011.08.007
- Gombac, V., Sordelli, L., Montini, T., Delgado, J. J., Adamski, A., Adami, G., . . . Fornasiero, P. (2010). CuOx-TiO2 Photocatalysts for H₂ Production from Ethanol and Glycerol Solutions. *Journal of Physical Chemistry A*, 114(11), 3916-3925. doi: 10.1021/jp907242q
- Goncalves, V. L. C., Pinto, B. P., Silva, J. C., & Mota, C. J. A. (2008). Acetylation of glycerol catalyzed by different solid acids. *Catalysis Today*, 133, 673-677. doi: 10.1016/j.cattod.2007.12.037
- Guan, G., Kusakabe, K., Sakurai, N., & Moriyama, K. (2009). Transesterification of vegetable oil to biodiesel fuel using acid catalysts in the presence of dimethyl ether. *Fuel*, 88(1), 81-86. doi: 10.1016/j.fuel.2008.07.021

1. INTRODUCCIÓN

- Guan, G., Teshima, M., Sato, C., Son, S. M., Irfan, M. F., Kusakabe, K., . . . Lin, T.-J. (2010). Two-Phase Flow Behavior in Microtube Reactors During Biodiesel Production from Waste Cooking Oil. *Aiche Journal*, *56*(5), 1383-1390. doi: 10.1002/aic.12042
- Guldhe, A., Singh, B., Mutanda, T., Perrnau, K., & Bux, F. (2015). Advances in synthesis of biodiesel via enzyme catalysis: Novel and sustainable approaches. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, *41*, 1447-1464. doi: 10.1016/j.rser.2014.09.035
- Guncheva, M., & Zhiryakova, D. (2011). Catalytic properties and potential applications of *Bacillus lipases*. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, *68*(1), 1-21. doi: 10.1016/j.molcatb.2010.09.002
- Guo, X., Li, Y., Shi, R., Liu, Q., Zhan, E., & Shen, W. (2009). Co/MgO catalysts for hydrogenolysis of glycerol to 1, 2-propanediol. *Applied Catalysis a-General*, *371*(1-2), 108-113. doi: 10.1016/j.apcata.2009.09.037
- Gupta, M. N., Kapoor, M., Majumder, A. B., & Singh, V. (2011). Isozymes, moonlighting proteins and promiscuous enzymes. *Current Science*, *100*(8), 1152-1162.
- Gupta, R., Gupta, N., & Rathi, P. (2004). Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *64*(6), 763-781. doi: 10.1007/s00253-004-1568-8
- Hajek, M., & Skopal, F. (2010). Treatment of glycerol phase formed by biodiesel production. *Bioresource Technology*, *101*(9), 3242-3245. doi: 10.1016/j.biortech.2009.12.094
- Hama, S., & Kondo, A. (2013). Enzymatic biodiesel production: An overview of potential feedstocks and process development. *Bioresource Technology*, *135*, 386-395. doi: 10.1016/j.biortech.2012.08.014
- Hama, S., Tamalampudi, S., Fukumizu, T., Miura, K., Yamaji, H., Kondo, A., & Fukuda, H. (2006). Lipase localization in *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles for use as whole-cell biocatalysts in biodiesel-fuel production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *101*(4), 328-333. doi: 10.1263/jbb.101.328
- Hara, P., Hanefeld, U., & Kanerva, L. T. (2008). Sol-gels and cross-linked aggregates of lipase PS from *Burkholderia cepacia* and their application in dry organic solvents. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, *50*(2-4), 80-86. doi: 10.1016/j.molcatb.2007.09.004
- Harding, K. G., Dennis, J. S., von Blottnitz, H., & Harrison, S. T. L. (2008). A life-cycle comparison between inorganic and biological catalysis for the production of biodiesel. *Journal of Cleaner Production*, *16*(13), 1368-1378. doi: 10.1016/j.jclepro.2007.07.003
- Hasan, F., Shah, A. A., & Hameed, A. (2006). Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, *39*(2), 235-251. doi: 10.1016/j.enzmictec.2005.10.016
- Haseeb, A., Sia, S. Y., Fazal, M. A., & Masjuki, H. H. (2010). Effect of temperature on tribological properties of palm biodiesel. *Energy*, *35*(3), 1460-1464. doi: 10.1016/j.energy.2009.12.001
- Hasheminejad, M., Tabatabaei, M., Mansourpanah, Y., Far, M. K., & Javani, A. (2011). Upstream and downstream strategies to economize biodiesel production. *Bioresource Technology*, *102*(2), 461-468. doi: 10.1016/j.biortech.2010.09.094
- He, Q., Xu, Y., Teng, Y., & Wang, D. (2008). Biodiesel production catalyzed by whole-cell lipase from *Rhizopus chinensis*. *Chinese Journal of Catalysis*, *29*(1), 41-46. doi: 10.1016/s1872-2067(08)60015-7

1. INTRODUCCIÓN

- Heimerma.Wh, Gordon, D. T., Kowalysh.De, Jensen, R. G., & Holman, R. T. (1973). EFFECT OF DOUBLE-BOND POSITION IN OCTADECENOATES UPON HYDROLYSIS BY PANCREATIC LIPASE. *Lipids*, 8(1), 45-46. doi: 10.1007/bf02533239
- Helwani, Z., Othman, M. R., Aziz, N., Fernando, W. J. N., & Kim, J. (2009). Technologies for production of biodiesel focusing on green catalytic techniques: A review. *Fuel Processing Technology*, 90(12), 1502-1514. doi: 10.1016/j.fuproc.2009.07.016
- Hernandez, K., Garcia-Verdugo, E., Porcar, R., & Fernandez-Lafuente, R. (2011). Hydrolysis of triacetin catalyzed by immobilized lipases: Effect of the immobilization protocol and experimental conditions on diacetin yield. *Enzyme and Microbial Technology*, 48(6-7), 510-517. doi: 10.1016/j.enzmictec.2011.02.005
- Hernandez-Martin, E., & Otero, C. (2008). Different enzyme requirements for the synthesis of biodiesel: Novozym (R) 435 and Lipozyme (R) TL IM. *Bioresource Technology*, 99(2), 277-286. doi: 10.1016/j.biortech.2006.12.024
- Hills, M. J., Kiewitt, I., & Mukherjee, K. D. (1990). LIPASE FROM BRASSICA-NAPUS L DISCRIMINATES AGAINST CIS-4 AND CIS-6 UNSATURATED FATTY-ACIDS AND SECONDARY AND TERTIARY ALCOHOLS. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1042(2), 237-240. doi: 10.1016/0005-2760(90)90014-o
- Hirose, Y., Kariya, K., Sasaki, I., Kurono, Y., Ebiike, H., & Achiwa, K. (1992). DRASTIC SOLVENT EFFECT ON LIPASE-CATALYZED ENANTIOSELECTIVE HYDROLYSIS OF PROCHIRAL 1,4-DIHYDROPYRIDINES. *Tetrahedron Letters*, 33(47), 7157-7160. doi: 10.1016/s0040-4039(00)60861-4
- Hjorth, A., Carriere, F., Cudrey, C., Woldike, H., Boel, E., Lawson, D. M., . . . Verger, R. (1993). A STRUCTURAL DOMAIN (THE LID) FOUND IN PANCREATIC LIPASES IS ABSENT IN THE GUINEA-PIG (PHOSPHO)LIPASE. *Biochemistry*, 32(18), 4702-4707. doi: 10.1021/bi00069a003
- Hobbs, H. R., Kondor, B., Stephenson, P., Sheldon, R. A., Thomas, N. R., & Poliakoff, M. (2006). Continuous kinetic resolution catalysed by cross-linked enzyme aggregates, 'CLEAs', in supercritical CO₂. *Green Chemistry*, 8(9), 816-821. doi: 10.1039/b604738f
- Holmberg, K., & Osterberg, E. (1988). ENZYMATIC PREPARATION OF MONOGLYCERIDES IN MICROEMULSION. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 65(9), 1544-1548. doi: 10.1007/bf02898325
- Houde, A., Kademi, A., & Leblanc, D. (2004). Lipases and their industrial applications - An overview. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 118(1-3), 155-170. doi: 10.1385/abab:118:1-3:155
- Huber, G. W., O'Connor, P., & Corma, A. (2007). Processing biomass in conventional oil refineries: Production of high quality diesel by hydrotreating vegetable oils in heavy vacuum oil mixtures. *Applied Catalysis a-General*, 329, 120-129. doi: 10.1016/j.apcata.2007.07.002
- Hult, K., & Berglund, P. (2007). Enzyme promiscuity: mechanism and applications. *Trends in Biotechnology*, 25(5), 231-238. doi: 10.1016/j.tibtech.2007.03.002
- I, Ç. (2011). The Effect of Biodiesel, Ethanol and Diesel Fuel Blends on The Performance and Exhaust Emissions in A DI Diesel Engine (pp. 341-346). Gazi Univ J Sci

1. INTRODUCCIÓN

- Ilham, Z., & Saka, S. (2009). Dimethyl carbonate as potential reactant in non-catalytic biodiesel production by supercritical method. *Bioresource Technology*, *100*(5), 1793-1796. doi: 10.1016/j.biortech.2008.09.050
- Ilham, Z., & Saka, S. (2010). Two-step supercritical dimethyl carbonate method for biodiesel production from *Jatropha curcas* oil. *Bioresource Technology*, *101*(8), 2735-2740. doi: 10.1016/j.biortech.2009.10.053
- Ilham, Z., & Saka, S. (2012). Optimization of supercritical dimethyl carbonate method for biodiesel production. *Fuel*, *97*, 670-677. doi: 10.1016/j.fuel.2012.02.066
- Islam, M. R., Kurle, Y. M., Gossage, J. L., & Benson, T. J. (2013). Kinetics of Triazabicyclodecene-Catalyzed Canola Oil Conversion to Glycerol-free Biofuel Using Dimethyl Carbonate. *Energy & Fuels*, *27*(3), 1564-1569. doi: 10.1021/ef400048v
- Jachmanian, I., Schulte, E., & Mukherjee, K. D. (1996). Substrate selectivity in esterification of less common fatty acids catalysed by lipases from different sources. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *44*(5), 563-567.
- Jaeger, K. E., Dijkstra, B. W., & Reetz, M. T. (1999). Bacterial biocatalysts: Molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annual Review of Microbiology*, *53*, 315-+. doi: 10.1146/annurev.micro.53.1.315
- Jaeger, K. E., & Eggert, T. (2002). Lipases for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, *13*(4), 390-397. doi: 10.1016/s0958-1669(02)00341-5
- Jaeger, K. E., Ransac, S., Dijkstra, B. W., Colson, C., Vanheuvel, M., & Misset, O. (1994). BACTERIAL LIPASES. *Fems Microbiology Reviews*, *15*(1), 29-63. doi: 10.1111/j.1574-6976.1994.tb00121.x
- Jaganjac, M., Prah, I. O., Cipak, A., Cindric, M., Mrakovcic, L., Tatzber, F., . . . Zarkovic, N. (2012). Effects of bioreactive acrolein from automotive exhaust gases on human cells in vitro. *Environmental Toxicology*, *27*(11), 644-652. doi: 10.1002/tox.20683
- Janssens, L., Depooter, H. L., Schamp, N. M., & Vandamme, E. J. (1992). PRODUCTION OF FLAVORS BY MICROORGANISMS. *Process Biochemistry*, *27*(4), 195-215. doi: 10.1016/0032-9592(92)80020-4
- Jayed, M. H., Masjuki, H. H., Kalam, M. A., Mahlia, T. M. I., Husnawan, M., & Liaquat, A. M. (2011). Prospects of dedicated biodiesel engine vehicles in Malaysia and Indonesia. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, *15*(1), 220-235. doi: 10.1016/j.rser.2010.09.002
- Jegannathan, K. R., Eng-Seng, C., & Ravindra, P. (2011). Economic assessment of biodiesel production: Comparison of alkali and biocatalyst processes. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, *15*(1), 745-751. doi: 10.1016/j.rser.2010.07.055
- Jensen, R. G. (1974). CHARACTERISTICS OF LIPASE FROM MOLD, *GEOTRICHUM-CANDIDUM*. *Lipids*, *9*(3), 149-157. doi: 10.1007/bf02532686
- Jensen, R. G., Dejong, F. A., & Clark, R. M. (1983). DETERMINATION OF LIPASE SPECIFICITY. *Lipids*, *18*(3), 239-252. doi: 10.1007/bf02534556
- Jeong, G.-T., & Park, D.-H. (2010). Synthesis of Rapeseed Biodiesel Using Short-Chained Alkyl Acetates as Acyl Acceptor. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *161*(1-8), 195-208. doi: 10.1007/s12010-009-8777-7

1. INTRODUCCIÓN

- Juan, J. C., Kartika, D. A., Wu, T. Y., & Hin, T.-Y. Y. (2011). Biodiesel production from jatropha oil by catalytic and non-catalytic approaches: An overview. *Bioresource Technology*, *102*(2), 452-460. doi: 10.1016/j.biortech.2010.09.093
- Kahveci, D., & Xu, X. (2011). Repeated hydrolysis process is effective for enrichment of omega 3 polyunsaturated fatty acids in salmon oil by *Candida rugosa* lipase. *Food Chemistry*, *129*(4), 1552-1558. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.05.142
- Kamiya, N., & Goto, M. (1998). Preparation of surfactant-coated lipases utilizing the molecular imprinting technique. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, *85*(2), 237-239. doi: 10.1016/s0922-338x(97)86774-8
- Kapoor, M., & Gupta, M. N. (2012). Lipase promiscuity and its biochemical applications. *Process Biochemistry*, *47*(4), 555-569. doi: 10.1016/j.procbio.2012.01.011
- Kartal, F., Janssen, M. H. A., Hollmann, F., Sheldon, R. A., & Kilinc, A. (2011). Improved esterification activity of *Candida rugosa* lipase in organic solvent by immobilization as Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, *71*(3-4), 85-89. doi: 10.1016/j.molcatb.2011.04.002
- Katryniok, B., Paul, S., Belliere-Baca, V., Rey, P., & Dumeignil, F. (2010). Glycerol dehydration to acrolein in the context of new uses of glycerol. *Green Chemistry*, *12*(12), 2079-2098. doi: 10.1039/c0gc00307g
- Khersonsky, O., & Tawfik, D. S. (2010). Enzyme Promiscuity: A Mechanistic and Evolutionary Perspective. *Annual Review of Biochemistry*, *Vol 79*, *79*, 471-505. doi: 10.1146/annurev-biochem-030409-143718
- Kijenski, J., Rozycki, K., Lipkowski, A. W., & Walisiewicz-Niedbalska, W. (2007). New ester biofuel Glicerol (R). *Przemysl Chemiczny*, *86*(4), 269-272.
- Kim, S.-J., Jung, S.-M., Park, Y.-C., & Park, K. (2007). Lipase catalyzed transesterification of soybean oil using ethyl acetate, an alternative acyl acceptor. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, *12*(4), 441-445. doi: 10.1007/bf02931068
- Knothe, G. (2010). Biodiesel and renewable diesel: A comparison. *Progress in Energy and Combustion Science*, *36*(3), 364-373. doi: 10.1016/j.pecs.2009.11.004
- Krishna, S. H., & Karanth, N. G. (2002). Lipases and lipase-catalyzed esterification reactions in nonaqueous media. *Catalysis Reviews-Science and Engineering*, *44*(4), 499-591. doi: 10.1081/cr-120015481
- Krishna, S. H., Manohar, B., Divakar, S., Prapulla, S. G., & Karanth, N. G. (2000). Optimization of isoamyl acetate production by using immobilized lipase from *Mucor miehei* by response surface methodology. *Enzyme and Microbial Technology*, *26*(2-4), 131-136.
- Kubicka, D., & Kaluza, L. (2010). Deoxygenation of vegetable oils over sulfided Ni, Mo and NiMo catalysts. *Applied Catalysis a-General*, *372*(2), 199-208. doi: 10.1016/j.apcata.2009.10.034
- Kumar, S., Kikon, K., Upadhyay, A., Kanwar, S. S., & Gupta, R. (2005). Production, purification, and characterization of lipase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus coagulans* BTS-3. *Protein Expression and Purification*, *41*(1), 38-44. doi: 10.1016/j.pep.2004.12.010
- Kumari, V., Shah, S., & Gupta, M. N. (2007). Preparation of biodiesel by lipase-catalyzed transesterification of high free fatty acid containing oil from *Madhuca indica*. *Energy & Fuels*, *21*(1), 368-372. doi: 10.1021/ef0602168

1. INTRODUCCIÓN

- Kunkes, E. L., Soares, R. R., Simonetti, D. A., & Dumesic, J. A. (2009). An integrated catalytic approach for the production of hydrogen by glycerol reforming coupled with water-gas shift. *Applied Catalysis B-Environmental*, 90(3-4), 693-698. doi: 10.1016/j.apcatb.2009.04.032
- Kurle, Y. M., Islam, M. R., & Benson, T. J. (2013). Process development and simulation of glycerol-free biofuel from canola oil and dimethyl carbonate. *Fuel Processing Technology*, 114, 49-57. doi: 10.1016/j.fuproc.2013.03.030
- Lang, D. A., & Dijkstra, B. W. (1998). Structural investigations of the regio- and enantioselectivity of lipases. *Chemistry and Physics of Lipids*, 93(1-2), 115-122. doi: 10.1016/s0009-3084(98)00035-8
- Lang, D. A., Manesse, M. L. M., De Haas, G. H., Verheij, H. M., & Dijkstra, B. W. (1998). Structural basis of the chiral selectivity of *Pseudomonas cepacia* lipase. *European Journal of Biochemistry*, 254(2), 333-340. doi: 10.1046/j.1432-1327.1998.2540333.x
- Lapuerta, M., Garcia-Contreras, R., & Agudelo, J. R. (2010). Lubricity of Ethanol-Biodiesel-Diesel Fuel Blends. *Energy & Fuels*, 24, 1374-1379. doi: 10.1021/ef901082k
- Lapuerta, M., Villajos, M., Agudelo, J. R., & Boehman, A. L. (2011). Key properties and blending strategies of hydrotreated vegetable oil as biofuel for diesel engines. *Fuel Processing Technology*, 92(12), 2406-2411. doi: 10.1016/j.fuproc.2011.09.003
- Lee, C. H., & Parkin, K. L. (2000). Comparative fatty acid selectivity of lipases in esterification reactions with glycerol and diol analogues in organic media. *Biotechnology Progress*, 16(3), 372-377. doi: 10.1021/bp000012o
- Leoneti, A. B., Aragao-Leoneti, V., & Walter Borges de Oliveira, S. V. (2012). Glycerol as a by-product of biodiesel production in Brazil: Alternatives for the use of unrefined glycerol. *Renewable Energy*, 45, 138-145. doi: 10.1016/j.renene.2012.02.032
- Li, C., Feng, X.-W., Wang, N., Zhou, Y.-J., & Yu, X.-Q. (2008). Biocatalytic promiscuity: the first lipase-catalysed asymmetric aldol reaction. *Green Chemistry*, 10(6), 616-618. doi: 10.1039/b803406k
- Li, J., & Wang, T. (2010). Coupling reaction and azeotropic distillation for the synthesis of glycerol carbonate from glycerol and dimethyl carbonate. *Chemical Engineering and Processing*, 49(5), 530-535. doi: 10.1016/j.cep.2010.04.003
- Li, K., He, T., Li, C., Feng, X.-W., Wang, N., & Yu, X.-Q. (2009). Lipase-catalysed direct Mannich reaction in water: utilization of biocatalytic promiscuity for C-C bond formation in a "one-pot" synthesis. *Green Chemistry*, 11(6), 777-779. doi: 10.1039/b817524a
- Li, N., & Zong, M.-H. (2010). Lipases from the genus *Penicillium*: Production, purification, characterization and applications. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 66(1-2), 43-54. doi: 10.1016/j.molcatb.2010.05.004
- Li, Q., Guo, B., Yu, J., Ran, J., Zhang, B., Yan, H., & Gong, J. R. (2011). Highly Efficient Visible-Light-Driven Photocatalytic Hydrogen Production of CdS-Cluster-Decorated Graphene Nanosheets. *Journal of the American Chemical Society*, 133(28), 10878-10884. doi: 10.1021/ja2025454
- Li, W., Du, W., Li, Q., Li, R.-W., & Liu, D. (2010). Dependence on the properties of organic solvent: Study on acyl migration kinetics of partial glycerides. *Bioresource Technology*, 101(15), 5737-5742. doi: 10.1016/j.biortech.2010.03.018

1. INTRODUCCIÓN

- Li, W., Du, W., Li, Q., Sun, T., & Liu, D. (2010). Study on acyl migration kinetics of partial glycerides: Dependence on temperature and water activity. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 63(1-2), 17-22. doi: 10.1016/j.molcatb.2009.11.012
- Li, W., Du, W., & Liu, D. (2007). Optimization of whole cell-catalyzed methanolysis of soybean oil for biodiesel production using response surface methodology. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 45(3-4), 122-127. doi: 10.1016/j.molcatb.2007.01.002
- Li, W., Du, W., & Liu, D. H. (2008). *Rhizopus oryzae* whole-cell-catalyzed biodiesel production from oleic acid in tert-butanol medium. *Energy & Fuels*, 22(1), 155-158. doi: 10.1021/ef700624v
- Li, W., Li, R.-W., Li, Q., Du, W., & Liu, D. (2010). Acyl migration and kinetics study of 1(3)-positional specific lipase of *Rhizopus oryzae*-catalyzed methanolysis of triglyceride for biodiesel production. *Process Biochemistry*, 45(12), 1888-1893. doi: 10.1016/j.procbio.2010.03.034
- Li, Y., Zhao, X. Q., & Wang, Y. J. (2005). Synthesis of dimethyl carbonate from methanol, propylene oxide and carbon dioxide over KOH/4A molecular sieve catalyst. *Applied Catalysis a-General*, 279(1-2), 205-208. doi: 10.1016/j.apcata.2004.10.030
- Liang, D., Gao, J., Wang, J., Chen, P., Hou, Z., & Zheng, X. (2009). Selective oxidation of glycerol in a base-free aqueous solution over different sized Pt catalysts. *Catalysis Communications*, 10(12), 1586-1590. doi: 10.1016/j.catcom.2009.04.023
- Liu, X., He, H., Wang, Y., Zhu, S., & Piao, X. (2008). Transesterification of soybean oil to biodiesel using CaO as a solid base catalyst. *Fuel*, 87(2), 216-221. doi: 10.1016/j.fuel.2007.04.013
- Long, K., Ghazali, H. M., Ariff, A., Man, Y. C., & Bucke, C. (1998). Substrate preference of mycelium-bound lipase from a strain of *Aspergillus flavus* Link. *Biotechnology Letters*, 20(4), 369-372. doi: 10.1023/a:1005327330034
- Luna, C., Sancho, E., Luna, D., Caballero, V., Calero, J., Posadillo, A., . . . Romero, A. A. (2013). Biofuel that Keeps Glycerol as Monoglyceride by 1,3-Selective Ethanolysis with Pig Pancreatic Lipase Covalently Immobilized on AlPO₄ Support. *Energies*, 6(8), 3879-3900. doi: 10.3390/en6083879
- Luna, C., Sancho, E. D., Luna, D., Calero, J., Verdugo, C., Posadillo, A., . . . Romero, A., A. (2014). PRODUCTION OF A BIOFUEL SIMILAR TO CONVENTIONAL BIODIESEL THAT AVOIDS RESIDUAL GLYCEROL BY USING LIPOPAN 50BG, A LOW COST COMMERCIAL *THERMOMYCES LANUGINOSUS* LIPASE. *Récents Progrès en Génie des Procédés*, 106(GPE – 4th International Congress on Green Process Engineering 7-10 April 2014 – Sevilla (Spain)).
- Luna, C., Verdugo, C., Sancho, E. D., Luna, D., Calero, J., Posadillo, A., . . . Romero, A. A. (2014a). A Biofuel Similar to Biodiesel Obtained by Using a Lipase from *Rhizopus oryzae*, Optimized by Response Surface Methodology. *Energies*, 7(5), 3383-3399. doi: 10.3390/en7053383
- Luna, C., Verdugo, C., Sancho, E. D., Luna, D., Calero, J., Posadillo, A., . . . Romero, A. A. (2014b). Biocatalytic Behaviour of Immobilized *Rhizopus oryzae* Lipase in the 1,3-Selective Ethanolysis of Sunflower Oil to Obtain a Biofuel Similar to Biodiesel. *Molecules*, 19(8), 11419-11439. doi: 10.3390/molecules190811419

1. INTRODUCCIÓN

- Luna, C., Verdugo, C., Sancho, E. D., Luna, D., Calero, J., Posadillo, A., . . . Romero, A. A. (2014c). Production of a biodiesel-like biofuel without glycerol generation, by using Novozym 435, an immobilized *Candida antarctica* lipase. *Bioresources and Bioprocessing*, 1(11). doi:10.1186/s40643-014-0011-y
- Luna, C., Verdugo, C., Sancho, E. D., Luna, D., Calero, J., Posadillo, A., . . . Romero, A. A. (2014d). Production of a biodiesel-like biofuel without glycerol generation, by using Novozym 435, an immobilized *Candida antarctica* lipase. *Bioresources and Bioprocessing*, 1(11). doi:10.1186/s40643-014-0011-y
- Luna, D., Calero, J., Sancho, E. D., Luna, C., Posadillo, A., Bautista, F. M., . . . Verdugo, C. (2014). Technological challenges for the production of biodiesel in arid lands. *Journal of Arid Environments*, 102, 127-138. doi: 10.1016/j.jaridenv.2013.11.014
- Luna, D., Posadillo, A., Caballero, V., Verdugo, C., Bautista, F. M., Romero, A. A., . . . Calero, J. (2012). New Biofuel Integrating Glycerol into Its Composition Through the Use of Covalent Immobilized Pig Pancreatic Lipase. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(8), 10091-10112. doi: 10.3390/ijms130810091
- Luo, Z.-H., You, X.-Z., & Li, H.-R. (2009). Direct Preparation Kinetics of 1,3-Dichloro-2-propanol from Glycerol Using Acetic Acid Catalyst. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 48(1), 446-452. doi: 10.1021/ie8011177
- Luque, R., & Clark, J. H. (2011). Biodiesel-Like Biofuels from Simultaneous Transesterification/Esterification of Waste Oils with a Biomass-Derived Solid Acid Catalyst. *Chemcatchem*, 3(3), 594-597. doi: 10.1002/cctc.201000280
- Luque, R., Herrero-Davila, L., Campelo, J. M., Clark, J. H., Hidalgo, J. M., Luna, D., . . . Romero, A. A. (2008). Biofuels: a technological perspective. *Energy & Environmental Science*, 1(5), 542-564. doi: 10.1039/b807094f
- Macario, A., & Giordano, G. (2013). Catalytic Conversion of Renewable Sources for Biodiesel Production: A Comparison Between Biocatalysts and Inorganic Catalysts. *Catalysis Letters*, 143(2), 159-168. doi: 10.1007/s10562-012-0949-3
- Macario, A., Verri, F., Diaz, U., Corma, A., & Giordano, G. (2013). Pure silica nanoparticles for liposome/lipase system encapsulation: Application in biodiesel production. *Catalysis Today*, 204, 148-155. doi: 10.1016/j.cattod.2012.07.014
- Macrae, A. R., & Hammond, R. C. (1985). PRESENT AND FUTURE APPLICATIONS OF LIPASES. *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews*, 3, 193-217.
- Maddikeri, G. L., Pandit, A. B., & Gogate, P. R. (2013). Ultrasound assisted interesterification of waste cooking oil and methyl acetate for biodiesel and triacetin production. *Fuel Processing Technology*, 116, 241-249. doi: 10.1016/j.fuproc.2013.07.004
- Majumder, A. B., & Gupta, M. N. (2010). Stabilization of *Candida rugosa* lipase during transacetylation with vinyl acetate. *Bioresource Technology*, 101(8), 2877-2879. doi: 10.1016/j.biortech.2009.09.088
- Majumder, A. B., & Gupta, M. N. (2011). Increasing the catalytic efficiency of *Candida rugosa* lipase for the synthesis of tert-alkyl butyrates in low-water media. *Biocatalysis and Biotransformation*, 29(6), 238-245. doi: 10.3109/10242422.2011.615392

1. INTRODUCCIÓN

- Majumder, A. B., Mondal, K., Singh, T. P., & Gupta, M. N. (2008). Designing cross-linked lipase aggregates for optimum performance as biocatalysts. *Biocatalysis and Biotransformation*, 26(3), 235-242. doi: 10.1080/10242420701685601
- Majumder, A. B., Ramesh, N. G., & Gupta, M. N. (2009). A lipase catalyzed condensation reaction with a tricyclic diketone: yet another example of biocatalytic promiscuity. *Tetrahedron Letters*, 50(37), 5190-5193. doi: 10.1016/j.tetlet.2009.06.108
- Mantzouridou, F., Naziri, E., & Tsimidou, M. Z. (2008). Industrial glycerol as a supplementary carbon source in the production of beta-carotene by *Blakeslea trispora*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(8), 2668-2675. doi: 10.1021/jf703667d
- Marchetti, J. M., Miguel, V. U., & Errazu, A. F. (2007). Possible methods for biodiesel production. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, 11(6), 1300-1311. doi: 10.1016/j.rser.2005.08.006
- Martinek, K., & Mozhaev, V. V. (1985). Immobilization of enzymes: an approach to fundamental studies in biochemistry. *Advances in enzymology and related areas of molecular biology*, 57, 179-249.
- Matori, M., Asahara, T., & Ota, Y. (1991). REACTION CONDITIONS INFLUENCING POSITIONAL SPECIFICITY INDEX (PSI) OF MICROBIAL LIPASES. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 72(6), 413-415. doi: 10.1016/0922-338x(91)90046-j
- Matsumoto, T., Fukuda, H., Ueda, M., Tanaka, A., & Kondo, A. (2002). Construction of yeast strains with high cell surface lipase activity by using novel display systems based on the Flo1p flocculation functional domain. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(9), 4517-4522. doi: 10.1128/aem.68.9.4517-4522.2002
- Melero, J. A., Vicente, G., Morales, G., Paniagua, M., & Bustamante, J. (2010). Oxygenated compounds derived from glycerol for biodiesel formulation: Influence on EN 14214 quality parameters. *Fuel*, 89(8), 2011-2018. doi: 10.1016/j.fuel.2010.03.042
- Meng, Y.-L., Tian, S.-J., Li, S.-F., Wang, B.-Y., & Zhang, M.-H. (2013). Transesterification of rapeseed oil for biodiesel production in trickle-bed reactors packed with heterogeneous Ca/Al composite oxide-based alkaline catalyst. *Bioresource Technology*, 136, 730-734. doi: 10.1016/j.biortech.2013.03.081
- Mercader, F. d. M., Groeneveld, M. J., Kersten, S. R. A., Way, N. W. J., Schaverien, C. J., & Hogendoorn, J. A. (2010). Production of advanced biofuels: Co-processing of upgraded pyrolysis oil in standard refinery units. *Applied Catalysis B-Environmental*, 96(1-2), 57-66. doi: 10.1016/j.apcatb.2010.01.033
- Min, J. Y., & Lee, E. Y. (2011). Lipase-catalyzed simultaneous biosynthesis of biodiesel and glycerol carbonate from corn oil in dimethyl carbonate. *Biotechnology Letters*, 33(9), 1789-1796. doi: 10.1007/s10529-011-0627-3
- Modi, M. K., Reddy, J. R. C., Rao, B. V. S. K., & Prasad, R. B. N. (2007). Lipase-mediated conversion of vegetable oils into biodiesel using ethyl acetate as acyl acceptor. *Bioresource Technology*, 98(6), 1260-1264. doi: 10.1016/j.biortech.2006.05.006
- Mota, C. J. A., da Silva, C. X. A., Rosenbach, N., Jr., Costa, J., & da Silva, F. (2010). Glycerin Derivatives as Fuel Additives: The Addition of Glycerol/Acetone Ketal (Solketal) in Gasolines. *Energy & Fuels*, 24, 2733-2736. doi: 10.1021/ef9015735

1. INTRODUCCIÓN

- Mukherjee, K. D., Kiewitt, I., & Hills, M. J. (1993). SUBSTRATE SPECIFICITIES OF LIPASES IN VIEW OF KINETIC RESOLUTION OF UNSATURATED FATTY-ACIDS. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *40*(4), 489-493.
- Naik, S., Basu, A., Saikia, R., Madan, B., Paul, P., Chatterjee, R., . . . Svendsen, A. (2010). Lipases for use in industrial biocatalysis: Specificity of selected structural groups of lipases. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, *65*(1-4), 18-23. doi: 10.1016/j.molcatb.2010.01.002
- Naik, S. N., Goud, V. V., Rout, P. K., & Dalai, A. K. (2010). Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, *14*(2), 578-597. doi: 10.1016/j.rser.2009.10.003
- Nielsen, P. M., & Rancke-Madsen, A. (2011). Enzymatic large-scale production of biodiesel. *Lipid Technol*, *23*, 230–233.
- Niza, N. M., Tan, K. T., Ahmad, Z., & Lee, K. T. (2011). Comparison and optimisation of biodiesel production from *Jatropha curcas* oil using supercritical methyl acetate and methanol. *Chemical Papers*, *65*(5), 721-729. doi: 10.2478/s11696-011-0063-9
- Niza, N. M., Tan, K. T., Lee, K. T., & Ahmad, Z. (2013). Biodiesel production by non-catalytic supercritical methyl acetate: Thermal stability study. *Applied Energy*, *101*, 198+. doi: 10.1016/j.apenrgs.2012.03.033
- No, S.-Y. (2014). Application of hydrotreated vegetable oil from triglyceride based biomass to CI engines - A review. *Fuel*, *115*, 88-96. doi: 10.1016/j.fuel.2013.07.001
- Nunes, P. A., Pires-Cabral, P., & Ferreira-Dias, S. (2011). Production of olive oil enriched with medium chain fatty acids catalysed by commercial immobilised lipases. *Food Chemistry*, *127*(3), 993-998. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.01.071
- O'Brien, P. J., & Herschlag, D. (1999). Catalytic promiscuity and the evolution of new enzymatic activities. *Chemistry & Biology*, *6*(4), R91-R105. doi: 10.1016/s1074-5521(99)80033-7
- Ochoa-Gomez, J. R., Gomez-Jimenez-Aberasturi, O., Maestro-Madurga, B., Pesquera-Rodriguez, A., Ramirez-Lopez, C., Lorenzo-Ibarreta, L., . . . Villaran-Velasco, M. C. (2009). Synthesis of glycerol carbonate from glycerol and dimethyl carbonate by transesterification: Catalyst screening and reaction optimization. *Applied Catalysis a-General*, *366*(2), 315-324. doi: 10.1016/j.apcata.2009.07.020
- Oda, M., Kaieda, M., Hama, S., Yamaji, H., Kondo, A., Izumoto, E., & Fukuda, H. (2005). Facilitatory effect of immobilized lipase-producing *Rhizopus oryzae* cells on acyl migration in biodiesel-fuel production. *Biochemical Engineering Journal*, *23*(1), 45-51. doi: 10.1016/j.bej.2004.10.009
- Oh, P. P., Lau, H. L. N., Chen, J. H., Chong, M. F., & Choo, Y. M. (2012). A review on conventional technologies and emerging process intensification (PI) methods for biodiesel production. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, *16*(7), 5131-5145. doi: 10.1016/j.rser.2012.05.014
- Ollis, D. L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S. M., . . . Goldman, A. (1992). THE ALPHA/BETA-HYDROLASE FOLD. *Protein Engineering*, *5*(3), 197-211. doi: 10.1093/protein/5.3.197
- Palit, S., Mandal, B. K., Ghosh, S., Bhowal, A. J., & Asme. (2009). PERFORMANCE AND EMISSION CHARACTERISTICS OF BIO-DIESEL AS AN ALTERNATIVE DIESEL ENGINE FUEL. *Es2008*:

1. INTRODUCCIÓN

- Proceedings of the 2nd International Conference on Energy Sustainability - 2008, Vol 1, 477-487.*
- Palomo, J. M. (2009). Modulation of Enzymes Selectivity Via Immobilization. *Current Organic Synthesis*, 6(1), 1-14.
- Palomo, J. M., Filice, M., Fernandez-Lafuente, R., Terreni, M., & Guisan, J. M. (2007). Regioselective hydrolysis of different peracetylated beta-monosaccharides by immobilized lipases from different sources. key role of the immobilization. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 349(11-12), 1969-1976. doi: 10.1002/adsc.20070055
- Palomo, J. M., Fuentes, M., Fernandez-Lorente, G., Mateo, C., Guisan, J. M., & Fernandez-Lafuente, R. (2003). General trend of lipase to self-assemble giving bimolecular aggregates greatly modifies the enzyme functionality. *Biomacromolecules*, 4(1), 1-6. doi: 10.1021/bm025729+
- Panchal, B. M., Dhoot, S. B., Deshmukh, S. A., Sharma, M. R., & Kachole, M. S. (2013). Production of DMC-BioD from Pongamia pinnata seed oil using dimethyl carbonate. *Fuel*, 109, 201-205. doi: 10.1016/j.fuel.2012.12.052
- Pang, X. B., Mu, Y. J., Yuan, J., & He, H. (2008). Carbonyls emission from ethanol-blended gasoline and biodiesel-ethanol-diesel used in engines. *Atmospheric Environment*, 42(6), 1349-1358. doi: 10.1016/j.atmosenv.2007.10.075
- Patil, P., Deng, S., Rhodes, J. I., & Lammers, P. J. (2010). Conversion of waste cooking oil to biodiesel using ferric sulfate and supercritical methanol processes. *Fuel*, 89(2), 360-364. doi: 10.1016/j.fuel.2009.05.024
- Pencreach, G., Leullier, M., & Baratti, J. C. (1997). Properties of free and immobilized lipase from *Pseudomonas cepacia*. *Biotechnology and Bioengineering*, 56(2), 181-189. doi: 10.1002/(sici)1097-0290(19971020)56:2<181::aid-bit7>3.0.co;2-l
- Piazza, G. J., Bilyk, A., Brower, D. P., & Haas, M. J. (1992). THE POSITIONAL AND FATTY-ACID SELECTIVITY OF OAT SEED LIPASE IN AQUEOUS EMULSIONS. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 69(10), 978-981. doi: 10.1007/bf02541061
- Pleiss, J., Fischer, M., & Schmid, R. D. (1998). Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site. *Chemistry and Physics of Lipids*, 93(1-2), 67-80. doi: 10.1016/s0009-3084(98)00030-9
- Prati, L., Spontoni, P., & Gaiassi, A. (2009). From Renewable to Fine Chemicals Through Selective Oxidation: The Case of Glycerol. *Topics in Catalysis*, 52(3), 288-296. doi: 10.1007/s11244-008-9165-1
- Quesada-Medina, J., & Olivares-Carrillo, P. (2011). Evidence of thermal decomposition of fatty acid methyl esters during the synthesis of biodiesel with supercritical methanol. *Journal of Supercritical Fluids*, 56(1), 56-63. doi: 10.1016/j.supflu.2010.11.016
- Rahmat, N., Abdullah, A. Z., & Mohamed, A. R. (2010). Recent progress on innovative and potential technologies for glycerol transformation into fuel additives: A critical review. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, 14(3), 987-1000. doi: 10.1016/j.rser.2009.11.010
- Rana, B. S., Kumar, R., Tiwari, R., Kumar, R., Joshi, R. K., Garg, M. O., & Sinha, A. K. (2013). Transportation fuels from co-processing of waste vegetable oil and gas oil mixtures. *Biomass & Bioenergy*, 56, 43-52. doi: 10.1016/j.biombioe.2013.04.029

1. INTRODUCCIÓN

- Ranganathan, S. V., Narasimhan, S. L., & Muthukumar, K. (2008). An overview of enzymatic production of biodiesel. *Bioresource Technology*, 99(10), 3975-3981. doi: 10.1016/j.biortech.2007.04.060
- Rangheard, M. S., Langrand, G., Triantaphylides, C., & Baratti, J. (1989). MULTI-COMPETITIVE ENZYMATIC-REACTIONS IN ORGANIC MEDIA - A SIMPLE TEST FOR THE DETERMINATION OF LIPASE FATTY-ACID SPECIFICITY. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1004(1), 20-28. doi: 10.1016/0005-2760(89)90207-5
- Rathore, V., & Madras, G. (2007). Synthesis of biodiesel from edible and non-edible oils in supercritical alcohols and enzymatic synthesis in supercritical carbon dioxide. *Fuel*, 86(17-18), 2650-2659. doi: 10.1016/j.fuel.2007.03.014
- Ribeiro, B. D., de Castro, A. M., Coelho, M. A. Z., & Freire, D. M. G. (2011). Production and use of lipases in bioenergy: a review from the feedstocks to biodiesel production. *Enzyme research*, 2011, 615803-615803. doi: 10.4061/2011/615803
- Ribeiro, N. M., Pinto, A. C., Quintella, C. M., da Rocha, G. O., Teixeira, L. S. G., Guarieiro, L. L. N., . . . de Andrade, J. B. (2007). The role of additives for diesel and diesel blended (Ethanol or biodiesel) fuels: A review. *Energy & Fuels*, 21(4), 2433-2445. doi: 10.1021/ef070060r
- Robles-Medina, A., Gonzalez-Moreno, P. A., Esteban-Cerdan, L., & Molina-Grima, E. (2009). Biocatalysis: Towards ever greener biodiesel production. *Biotechnology Advances*, 27(4), 398-408. doi: 10.1016/j.biotechadv.2008.10.008
- Rodrigues, R. C., & Fernandez-Lafuente, R. (2010). Lipase from *Rhizomucor miehei* as an industrial biocatalyst in chemical process. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 64(1-2), 1-22. doi: 10.1016/j.molcatb.2010.02.003
- Rogalska, E., Cudrey, C., Ferrato, F., & Verger, R. (1993). STEREOSELECTIVE HYDROLYSIS OF TRIGLYCERIDES BY ANIMAL AND MICROBIAL LIPASES. *Chirality*, 5(1), 24-30. doi: 10.1002/chir.530050106
- Rounce, P., Tsolakis, A., Leung, P., & York, A. P. E. (2010). A Comparison of Diesel and Biodiesel Emissions Using Dimethyl Carbonate as an Oxygenated Additive. *Energy & Fuels*, 24, 4812-4819. doi: 10.1021/ef100103z
- Roy, I., & Gupta, M. N. (2004). Freeze-drying of proteins: some emerging concerns. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 39, 165-177. doi: 10.1042/ba20030133
- Rubio, E., Fernandezmayorales, A., & Klibanov, A. M. (1991). EFFECT OF THE SOLVENT ON ENZYME REGIOSELECTIVITY. *Journal of the American Chemical Society*, 113(2), 695-696. doi: 10.1021/ja00002a060
- Ruzich, N. I., & Bassi, A. S. (2010). INVESTIGATION OF ENZYMATIC BIODIESEL PRODUCTION USING IONIC LIQUID AS A CO-SOLVENT. *Canadian Journal of Chemical Engineering*, 88(2), 277-282. doi: 10.1002/cjce.20263
- Saka, S., & Isayama, Y. (2009). A new process for catalyst-free production of biodiesel using supercritical methyl acetate. *Fuel*, 88(7), 1307-1313. doi: 10.1016/j.fuel.2008.12.028
- Sakthivel, A., Nakamura, R., Komura, K., & Sugi, Y. (2007). Esterification of glycerol by lauric acid over aluminium and zirconium containing mesoporous molecular sieves in supercritical carbon dioxide medium. *Journal of Supercritical Fluids*, 42(2), 219-225. doi: 10.1016/j.supflu.2007.03.012

1. INTRODUCCIÓN

- Saleh, J., Dube, M. A., & Tremblay, A. Y. (2011). Separation of glycerol from FAME using ceramic membranes. *Fuel Processing Technology*, 92(7), 1305-1310. doi: 10.1016/j.fuproc.2011.02.005
- Salihu, A., & Alam, M. Z. (2015). Solvent tolerant lipases: A review. *Process Biochemistry*, 50(1), 86-96. doi: 10.1016/j.procbio.2014.10.019
- Santacesaria, E., Tesser, R., Di Serio, M., Casale, L., & Verde, D. (2010). New Process for Producing Epichlorohydrin via Glycerol Chlorination. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 49(3), 964-970. doi: 10.1021/ie900650x
- Satyarthi, J. K., Chiranjeevi, T., Gokak, D. T., & Viswanathan, P. S. (2013). An overview of catalytic conversion of vegetable oils/fats into middle distillates. *Catalysis Science & Technology*, 3(1), 70-80. doi: 10.1039/c2cy20415k
- Saxena, R. K., Ghosh, P. K., Gupta, R., Davidson, W. S., Bradoo, S., & Gulati, R. (1999). Microbial lipases: Potential biocatalysts for the future industry. *Current Science*, 77(1), 101-115.
- Saxena, R. K., Sheoran, A., Giri, B., & Davidson, W. S. (2003). Purification strategies for microbial lipases. *Journal of Microbiological Methods*, 52(1), 1-18. doi: 10.1016/s0167-7012(02)00161-6
- Schmid, A., Dordick, J. S., Hauer, B., Kiener, A., Wubbolts, M., & Witholt, B. (2001). Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature*, 409(6817), 258-268. doi: 10.1038/35051736
- Schmid, A., Hollmann, F., Park, J. B., & Buhler, B. (2002). The use of enzymes in the chemical industry in Europe. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(4), 359-366. doi: 10.1016/s0958-1669(02)00336-1
- Schmid, R. D., & Verger, R. (1998). Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications. *Angewandte Chemie-International Edition*, 37(12), 1609-1633.
- Schrag, J. D., & Cygler, M. (1997). Lipases and alpha/beta hydrolase fold. *Lipases, Part a: Biotechnology*, 284, 85-107.
- Sergeeva, M. V., Mozhaev, V. V., Rich, J. O., & Khmel'nitsky, Y. L. (2000). Lipase-catalyzed transamidation of non-activated amides in organic solvent. *Biotechnology Letters*, 22(17), 1419-1422. doi: 10.1023/a:1005621117392
- Shah, S., & Gupta, M. N. (2007). Kinetic resolution of (+/-)-1-phenylethanol in Bmim PF6 using high activity preparations of lipases. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 17(4), 921-924. doi: 10.1016/j.bmcl.2006.11.057
- Shah, S., Sharma, S., & Gupta, M. N. (2003). Enzymatic transesterification for biodiesel production. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, 40(6), 392-399.
- Sharma, R., Chisti, Y., & Banerjee, U. C. (2001). Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances*, 19(8), 627-662. doi: 10.1016/s0734-9750(01)00086-6
- Sheldon, R. A. (2007). Enzyme immobilization: The quest for optimum performance. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 349(8-9), 1289-1307. doi: 10.1002/adsc.200700082
- Sheldon, R. A. (2011). Cross-Linked Enzyme Aggregates as Industrial Biocatalysts. *Organic Process Research & Development*, 15(1), 213-223. doi: 10.1021/op100289f
- Sheldon, R. A., & van Pelt, S. (2013). Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *Chemical Society Reviews*, 42(15), 6223-6235. doi: 10.1039/c3cs60075k
- Shi, N., Liu, Q.-y., Jiang, T., Wang, T.-j., Ma, L.-l., Zhang, Q., & Zhang, X.-h. (2012). Hydrodeoxygenation of vegetable oils to liquid alkane fuels over Ni/HZSM-5 catalysts:

1. INTRODUCCIÓN

- Methyl hexadecanoate as the model compound. *Catalysis Communications*, 20, 80-84. doi: 10.1016/j.catcom.2012.01.007
- Shieh, C. J., Liao, H. F., & Lee, C. C. (2003). Optimization of lipase-catalyzed biodiesel by response surface methodology. *Bioresource Technology*, 88(2), 103-106. doi: 10.1016/s0960-8524(02)00292-4
- Shimada, Y., Watanabe, Y., Samukawa, T., Sugihara, A., Noda, H., Fukuda, H., & Tominaga, Y. (1999). Conversion of vegetable oil to biodiesel using immobilized *Candida antarctica* lipase. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 76(7), 789-793. doi: 10.1007/s11746-999-0067-6
- Shimada, Y., Watanabe, Y., Sugihara, A., & Tominaga, Y. (2002). Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 17(3-5), 133-142. doi: 10.1016/s1381-1177(02)00020-6
- Siles, J. A., Martin, M. A., Chica, A. F., & Martin, A. (2010). Anaerobic co-digestion of glycerol and wastewater derived from biodiesel manufacturing. *Bioresource Technology*, 101(16), 6315-6321. doi: 10.1016/j.biortech.2010.03.042
- Singh, A., Nigam, P. S., & Murphy, J. D. (2011). Renewable fuels from algae: An answer to debatable land based fuels. *Bioresource Technology*, 102(1), 10-16. doi: 10.1016/j.biortech.2010.06.032
- Singh, B., Guldhe, A., Rawat, I., & Bux, F. (2014). Towards a sustainable approach for development of biodiesel from plant and microalgae. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, 29, 216-245. doi: 10.1016/j.rser.2013.08.067
- Sjursnes, B. J., & Anthonsen, T. (1994). ACYL MIGRATION IN 1,2-DIBUTYRIN DEPENDENCE ON SOLVENT AND WATER ACTIVITY. *Biocatalysis*, 9(1-4), 285-297. doi: 10.3109/10242429408992128
- Smith, B., Greenwell, H. C., & Whiting, A. (2009). Catalytic upgrading of tri-glycerides and fatty acids to transport biofuels. *Energy & Environmental Science*, 2(3), 262-271. doi: 10.1039/b814123a
- Solanki, K., & Gupta, M. N. (2011). A chemically modified lipase preparation for catalyzing the transesterification reaction in even highly polar organic solvents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 21(10), 2934-2936. doi: 10.1016/j.bmcl.2011.03.059
- Soliman, N. A., Knoll, M., Abdel-Fattah, Y. R., Schmid, R. D., & Lange, S. (2007). Molecular cloning and characterization of thermostable esterase and lipase from *Geobacillus thermoleovorans* YN isolated from desert soil in Egypt. *Process Biochemistry*, 42(7), 1090-1100. doi: 10.1016/j.procbio.2007.05.005
- Son, S. M., & Kusakabe, K. (2011). Transesterification of sunflower oil in a countercurrent trickle-bed reactor packed with a CaO catalyst. *Chemical Engineering and Processing*, 50(7), 650-654. doi: 10.1016/j.cep.2011.04.001
- Soriano, N. U., Jr., Venditti, R., & Argyropoulos, D. S. (2009). Biodiesel synthesis via homogeneous Lewis acid-catalyzed transesterification. *Fuel*, 88(3), 560-565. doi: 10.1016/j.fuel.2008.10.013
- Sotoft, L. F., Rong, B.-G., Christensen, K. V., & Norddahl, B. (2010). Process simulation and economical evaluation of enzymatic biodiesel production plant. *Bioresource Technology*, 101(14), 5266-5274. doi: 10.1016/j.biortech.2010.01.130

1. INTRODUCCIÓN

- Stelmachowski, M. (2011). UTILIZATION OF GLYCEROL, A BY-PRODUCT OF THE TRANSESTRIFICATION PROCESS OF VEGETABLE OILS: A REVIEW. *Ecological Chemistry and Engineering S-Chemia I Inzynieria Ekologiczna S*, 18(1), 9-30.
- Su, E., Du, L., Gong, X., & Wang, P. (2011). Lipase-Catalyzed Irreversible Transesterification of Jatropha Curcas L. Seed Oil to Fatty Acid Esters: An Optimization Study. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 88(6), 793-800. doi: 10.1007/s11746-010-1726-3
- Su, E., You, P., & Wei, D. (2009). In situ lipase-catalyzed reactive extraction of oilseeds with short-chained dialkyl carbonates for biodiesel production. *Bioresource Technology*, 100(23), 5813-5817. doi: 10.1016/j.biortech.2009.06.077
- Sun, S., Zhang, L., Meng, X., & Xin, Z. (2013). Kinetic study on lipase catalyzed transesterification of palm oil and dimethyl carbonate for biodiesel production. *Journal of Renewable and Sustainable Energy*, 5(3). doi: 10.1063/1.4803744
- Sun, T., Du, W., & Liu, D. (2011). Comparative study on stability of whole cells during biodiesel production in solvent-free system. *Process Biochemistry*, 46(3), 661-664. doi: 10.1016/j.procbio.2010.11.006
- Svedendahl, M., Carlqvist, P., Branneby, C., Allner, O., Frise, A., Hult, K., . . . Brinck, T. (2008). Direct Epoxidation in *Candida antarctica* Lipase B Studied by Experiment and Theory. *ChemBiochem*, 9(15), 2443-2451. doi: 10.1002/cbic.200800318
- Svedendahl, M., Hult, K., & Berglund, P. (2005). Fast carbon-carbon bond formation by a promiscuous lipase. *Journal of the American Chemical Society*, 127(51), 17988-17989. doi: 10.1021/ja056660r
- Szczesna-Antczak, M., Kubiak, A., Antczak, T., & Bielecki, S. (2009). Enzymatic biodiesel synthesis - Key factors affecting efficiency of the process. *Renewable Energy*, 34(5), 1185-1194. doi: 10.1016/j.renene.2008.11.013
- Taher, H., Al-Zuhair, S., AlMarzouqui, A., & Hashim, I. (2011). Extracted fat from lamb meat by supercritical CO₂ as feedstock for biodiesel production. *Biochemical Engineering Journal*, 55(1), 23-31. doi: 10.1016/j.bej.2011.03.003
- Tan, K. T., Lee, K. T., & Mohamed, A. R. (2010). A glycerol-free process to produce biodiesel by supercritical methyl acetate technology: an optimization study via Response Surface Methodology. *Bioresource technology*, 101(3), 965-969. doi: 10.1016/j.biortech.2009.09.004
- Tan, T. W., Lu, J. K., Nie, K. L., Deng, L., & Wang, F. (2010). Biodiesel production with immobilized lipase: A review (vol 28, pg 628, 2010). *Biotechnology Advances*, 28(6), 937-937. doi: 10.1016/j.biotechadv.2010.07.007
- Tan, T. W., Nie, K. L., & Wang, F. (2006). Production of biodiesel by immobilized *Candida* sp lipase at high water content. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 128(2), 109-116. doi: 10.1385/abab:128:2:109
- Tang, H., De Guzman, R., Salley, S., & Ng, K. Y. S. (2010). Comparing Process Efficiency in Reducing Steryl Glucosides in Biodiesel. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 87(3), 337-345. doi: 10.1007/s11746-009-1502-4
- Tang, H., Salley, S. O., & Ng, K. Y. S. (2008). Fuel properties and precipitate formation at low temperature in soy-, cottonseed-, and poultry fat-based biodiesel blends. *Fuel*, 87(13-14), 3006-3017. doi: 10.1016/j.fuel.2008.04.030

1. INTRODUCCIÓN

- Terradas, F., Testonhenry, M., Fitzpatrick, P. A., & Klibanov, A. M. (1993). MARKED DEPENDENCE OF ENZYME PROCHIRAL SELECTIVITY ON THE SOLVENT. *Journal of the American Chemical Society*, 115(2), 390-396. doi: 10.1021/ja00055a004
- Torre, O., Alfonso, I., & Gotor, V. (2004). Lipase catalysed Michael addition of secondary amines to acrylonitrile. *Chemical Communications*(15), 1724-1725. doi: 10.1039/b402244k
- Toth, C., Baladincz, P., Kovacs, S., & Hancsok, J. (2011). Producing clean diesel fuel by co-hydrogenation of vegetable oil with gas oil. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 13(4), 581-585. doi: 10.1007/s10098-011-0364-2
- Tuter, M., Babali, B., Kose, O., Dural, S., & Aksoy, H. A. (1999). Solvent-free glycerolysis of palm and palm kernel oils catalyzed by a 1,3-specific lipase and fatty acid composition of glycerolysis products. *Biotechnology Letters*, 21(3), 245-248. doi: 10.1023/a:1005464021613
- Tweddell, R. J., Kermasha, S., Combes, D., & Marty, A. (1998). Esterification and interesterification activities of lipases from *Rhizopus niveus* and *Mucor miehei* in three different types of organic media: a comparative study. *Enzyme and Microbial Technology*, 22(6), 439-445. doi: 10.1016/s0141-0229(97)00232-9
- Ulgen, A., & Hoelderich, W. (2009). Conversion of Glycerol to Acrolein in the Presence of WO₃/ZrO₂ Catalysts. *Catalysis Letters*, 131(1-2), 122-128. doi: 10.1007/s10562-009-9923-0
- Ulijn, R. V., & Halling, P. J. (2004). Solid-to-solid biocatalysis: thermodynamic feasibility and energy efficiency. *Green Chemistry*, 6(9), 488-496. doi: 10.1039/b406267a
- Uppenberg, J., Hansen, M. T., Patkar, S., & Jones, T. A. (1994). SEQUENCE, CRYSTAL-STRUCTURE DETERMINATION AND REFINEMENT OF 2 CRYSTAL FORMS OF LIPASE-B FROM *CANDIDA-ANTARCTICA*. *Structure*, 2(4), 293-308. doi: 10.1016/s0969-2126(00)00031-9
- Usai, E. M., Gualdi, E., Solinas, V., & Battistel, E. (2010). Simultaneous enzymatic synthesis of FAME and triacetyl glycerol from triglycerides and methyl acetate. *Bioresource Technology*, 101(20), 7707-7712. doi: 10.1016/j.biortech.2010.05.044
- Vasudevan, P. T., & Briggs, M. (2008). Biodiesel production-current state of the art and challenges. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 35(5), 421-430. doi: 10.1007/s10295-008-0312-2
- Vasudevan, P. T., & Fu, B. (2010). Environmentally Sustainable Biofuels: Advances in Biodiesel Research. *Waste and Biomass Valorization*, 1(1), 47-63. doi: 10.1007/s12649-009-9002-1
- Veljkovic, V. B., Stamenkovic, O. S., & Tasic, M. B. (2014). The wastewater treatment in the biodiesel production with alkali-catalyzed transesterification. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, 32, 40-60. doi: 10.1016/j.rser.2014.01.007
- Verdugo, C., Luna, D., Posadillo, A., Sancho, E. D., Rodriguez, S., Bautista, F., . . . Romero, A. A. (2011). Production of a new second generation biodiesel with a low cost lipase derived from *Thermomyces lanuginosus*: Optimization by response surface methodology. *Catalysis Today*, 167(1), 107-112. doi: 10.1016/j.cattod.2010.12.028
- Verdugo, C., Luque, R., Luna, D., Hidalgo, J. M., Posadillo, A., Sancho, E. D., . . . Romero, A. A. (2010). A comprehensive study of reaction parameters in the enzymatic production of

1. INTRODUCCIÓN

- novel biofuels integrating glycerol into their composition. *Bioresource Technology*, *101*(17), 6657-6662. doi: 10.1016/j.biortech.2010.03.089
- Veriansyah, B., Han, J. Y., Kim, S. K., Hong, S.-A., Kim, Y. J., Lim, J. S., . . . Kim, J. (2012). Production of renewable diesel by hydroprocessing of soybean oil: Effect of catalysts. *Fuel*, *94*(1), 578-585. doi: 10.1016/j.fuel.2011.10.057
- Vicente, G., Martinez, M., & Aracil, J. (2004). Integrated biodiesel production: a comparison of different homogeneous catalysts systems. *Bioresource Technology*, *92*(3), 297-305. doi: 10.1016/j.biortech.2003.08.014
- Viola, E., Blasi, A., Valerio, V., Guidi, I., Zimbardi, F., Braccio, G., & Giordano, G. (2012). Biodiesel from fried vegetable oils via transesterification by heterogeneous catalysis. *Catalysis Today*, *179*(1), 185-190. doi: 10.1016/j.cattod.2011.08.050
- Wadumesthrige, K., Ara, M., Salley, S. O., & Ng, K. Y. S. (2009). Investigation of Lubricity Characteristics of Biodiesel in Petroleum and Synthetic Fuel. *Energy & Fuels*, *23*, 2229-2234. doi: 10.1021/ef800887y
- Wang, C., Tian, Z., Wang, L., Xu, R., Liu, Q., Qu, W., . . . Wang, B. (2012). One-Step Hydrotreatment of Vegetable Oil to Produce High Quality Diesel-Range Alkanes. *ChemSuschem*, *5*(10), 1974-1983. doi: 10.1002/cssc.201200219
- Wang, L., Li, C., Wang, N., Li, K., Chen, X., & Yu, X.-Q. (2010). Enzyme-mediated domino synthesis of 2-alkylbenzimidazoles in solvent-free system: A green route to heterocyclic compound. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, *67*(1-2), 16-20. doi: 10.1016/j.molcatb.2010.06.013
- Wang, Y., & Cao, X. (2011). Enzymatic synthesis of fatty acid ethyl esters by utilizing camellia oil soapstocks and diethyl carbonate. *Bioresource Technology*, *102*(22), 10173-10179. doi: 10.1016/j.biortech.2011.09.004
- Wang, Y., Wu, H., & Zong, M. H. (2008). Improvement of biodiesel production by lipozyme TL IM-catalyzed methanolysis using response surface methodology and acyl migration enhancer. *Bioresource Technology*, *99*(15), 7232-7237. doi: 10.1016/j.biortech.2007.12.062
- Winkler, F. K., Darcy, A., & Hunziker, W. (1990). STRUCTURE OF HUMAN PANCREATIC LIPASE. *Nature*, *343*(6260), 771-774. doi: 10.1038/343771a0
- Wu, Q., Liu, B.-K., & Lin, X.-F. (2010). Enzymatic Promiscuity for Organic Synthesis and Cascade Process. *Current Organic Chemistry*, *14*(17), 1966-1988.
- Xu, Y. F., Wang, Q. J., Hu, X. G., Li, C., & Zhu, X. F. (2010). Characterization of the lubricity of bio-oil/diesel fuel blends by high frequency reciprocating test rig. *Energy*, *35*(1), 283-287. doi: 10.1016/j.energy.2009.09.020
- Yan, J., Yan, Y., Liu, S., Hu, J., & Wang, G. (2011). Preparation of cross-linked lipase-coated micro-crystals for biodiesel production from waste cooking oil. *Bioresource Technology*, *102*(7), 4755-4758. doi: 10.1016/j.biortech.2011.01.006
- Yang, T. K., Fruekilde, M. B., & Xu, X. B. (2005). Suppression of acyl migration in enzymatic production of structured lipids through temperature programming. *Food Chemistry*, *92*(1), 101-107. doi: 10.1016/j.foodchem.2004.07.007
- Yeo, S. H., Nihira, T., & Yamada, Y. (1998). Screening and identification of a novel lipase from *Burkholderia* sp. YY62 which hydrolyzes t-butyl esters effectively. *Journal of General and Applied Microbiology*, *44*(2), 147-152. doi: 10.2323/jgam.44.147

1. INTRODUCCIÓN

- Yoshida, A., Hama, S., Tamadani, N., Noda, H., Fukuda, H., & Kondo, A. (2012). Continuous production of biodiesel using whole-cell biocatalysts: Sequential conversion of an aqueous oil emulsion into anhydrous product. *Biochemical Engineering Journal*, *68*, 7-11. doi: 10.1016/j.bej.2012.07.002
- Yun, H., Wang, M., Feng, W., & Tan, T. (2013). Process simulation and energy optimization of the enzyme-catalyzed biodiesel production. *Energy*, *54*, 84-96. doi: 10.1016/j.energy.2013.01.002
- Yusuf, N. N. A. N., Kamarudin, S. K., & Yaakub, Z. (2011). Overview on the current trends in biodiesel production. *Energy Conversion and Management*, *52*(7), 2741-2751. doi: 10.1016/j.enconman.2010.12.004
- Zeng, J., Du, W., Liu, X., Liu, D., & Dai, L. (2006). Study on the effect of cultivation parameters and pretreatment on *Rhizopus oryzae* cell-catalyzed transesterification of vegetable oils for biodiesel production. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, *43*(1-4), 15-18. doi: 10.1016/j.molcatb.2006.03.007
- Zhang, K.-P., Lai, J.-Q., Huang, Z.-L., & Yang, Z. (2011). *Penicillium expansum* lipase-catalyzed production of biodiesel in ionic liquids. *Bioresource Technology*, *102*(3), 2767-2772. doi: 10.1016/j.biortech.2010.11.057
- Zhang, L., Sun, S., Xin, Z., Sheng, B., & Liu, Q. (2010). Synthesis and component confirmation of biodiesel from palm oil and dimethyl carbonate catalyzed by immobilized-lipase in solvent-free system. *Fuel*, *89*(12), 3960-3965. doi: 10.1016/j.fuel.2010.06.030
- Zhao, L., Zheng, L., Gao, G., Ha, F., & Cao, S. (2008). Resolution of N-(2-ethyl-6-methylphenyl) alanine via cross-linked aggregates of *Pseudomonas* sp Lipase. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, *54*(1-2), 7-12. doi: 10.1016/j.molcatb.2007.12.001
- Zhao, X., Qi, F., Yuan, C., Du, W., & Liu, D. (2015). Lipase-catalyzed process for biodiesel production: Enzyme immobilization, process simulation and optimization. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, *44*, 182-197. doi: 10.1016/j.rser.2014.12.021
- Zheng, J., Xu, L., Liu, Y., Zhang, X., & Yan, Y. (2012). Lipase-coated K₂SO₄ micro-crystals: Preparation, characterization, and application in biodiesel production using various oil feedstocks. *Bioresource Technology*, *110*, 224-231. doi: 10.1016/j.biortech.2012.01.088
- Zheng, Y., Chen, X., & Shen, Y. (2008). Commodity Chemicals Derived from Glycerol, an Important Biorefinery Feedstock (Retracted Article. See vol 110, pg 1807, 2010). *Chemical Reviews*, *108*(12), 5253-5277. doi: 10.1021/cr068216s
- Zope, B. N., & Davis, R. J. (2009). Influence of Reactor Configuration on the Selective Oxidation of Glycerol over Au/TiO₂. *Topics in Catalysis*, *52*(3), 269-277. doi: 10.1007/s11244-008-9163-3



Ramón Lapayese del Río (1956)

2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Independientemente del sistema biocatalítico (diversas lipasas, libres o inmovilizadas comerciales, lipasas libres comerciales inmovilizadas en laboratorio o extractos enzimáticos lipasídicos obtenidos a partir de cultivos microbianos líquidos), todos tienen en común, que se aplican operando en el mismo sistema de reacción, tanque tipo "batch" con agitación y temperatura constante, donde se desarrolla la transesterificación, o etanolisis, parcial del aceite de girasol, que se emplea como materia prima estándar, fuente de triglicéridos. Los productos de reacción se caracterizan en todos los casos mediante Cromatografía de Gases.

En este capítulo, se explica primero en su correspondiente apartado el diseño experimental, así como los modelos utilizados para relacionar las variables dependientes con las independientes y evaluar qué variables son las más influyentes para su optimización. También se detalla cómo se han caracterizado los productos de reacción, además de la materia prima y finalmente cómo se han elaborado los diferentes sistemas biocatalíticos ensayados.

2.1. MÉTODOS DE ANÁLISIS.

Teniendo en cuenta que el aceite de girasol aplicado como estándar, está constituido por una mezcla de ácidos grasos en proporción variable (fundamentalmente oléico, linoléico y esteárico, como sucede en la mayoría de los aceites obtenidos de diferentes semillas), según se recoge en la siguiente **Tabla 2.1.**, los resultados de las reacciones se expresan a partir de las cantidades relativas de los correspondientes ésteres etílicos (FAEE, Fatty Acid Ethyl Esters), y monoglicéridos (MG), respecto a la suma de las cantidades de diglicéridos (DG) y triglicéridos que no han reaccionado (TG), determinadas por cromatografía de gases, por diferencia respecto al cetano (n-hexadecano) empleado como patrón interno. El empleo de patrón interno viene determinado porque los diglicéridos y triglicéridos no se separan adecuadamente en la cromatografía de gases.

El n-hexadecano o cetano, un hidrocarburo lineal, es precisamente el estándar empleado para determinar el denominado Índice de cetano, que expresa la calidad de un combustible diésel. Así, el cetanaje o índice de cetano corresponde a la cantidad presente (porcentaje en volumen) de cetano en una mezcla de referencia con igual punto de inflamación que el carburante (hidrocarburo) sometido a prueba. El número o índice de cetano guarda relación con el tiempo que transcurre entre la inyección del carburante y el comienzo de su combustión. Una combustión de calidad ocurre cuando se produce una ignición rápida seguida de un quemado total y uniforme del carburante.

2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Tabla 2.1. Composición de ácidos grasos de los principales aceites vegetales.

Tipos de Ácido Graso	Oliva	Colza	Soja	Girasol	Palma	Coco	Jatrofa
Ac. Caprílico (8:0)	0					7.0%	
Ac. Cáprico (10:0)	0					5.7%	
Ac. Laurico (12:0)	0					42.4%	
Ac. Mirístico (14:0)	0.05%				1.3%	18.1%	-
Ac. Palmítico (16:0)	12%	6.2%	13.0 %	8.0%	44.7%	11.3%	17.7%
Ac. Palmitoleico (18:0)	2%	2.2%	4.7%	4.9%	5.4%	4.2%	7.9%
Ac. Araquídico (20:0)	0.25%	0.9%	0.5%	---	0.5%	---	---
Ac. Behénico (22:0)	0.1	---	0.8%	1.2%			
Ac. Oleico (18:1)	75%	55.5%	23.9 %	28.9%	37.2%	8.7%	37.8%
Ac. Linoleico (18:2)	9%	22.6%	49.6 %	56.5%	10.8%	2.5%	36.6%
Ac. Linolénico (18:3)	0.75%	12.6%	7.3%	0.7%			

Cuanto más elevado es el número de cetano, menor es el retraso de la ignición y mejor es la calidad de combustión. Por el contrario, aquellos carburantes con un bajo número de cetano requieren mayor tiempo para que ocurra la ignición y después queman muy rápidamente, produciendo una rápida elevación de presión. Si el número de cetano es demasiado bajo, la combustión es inadecuada y da lugar a ruido excesivo, aumento de las emisiones, reducción en el rendimiento del vehículo y aumento de la fatiga del motor. Un humo y ruido excesivos son problemas comunes en los vehículos con motores diésel, especialmente bajo condiciones de arranque en frío. En definitiva es un indicativo de la eficiencia de la reacción que se lleva a cabo en los motores de combustión interna.

2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Con el análisis cromatográfico se cuantifican, mediante el uso del patrón interno empleado, el cetano, los productos obtenidos a partir de los triglicéridos (TG) que no son detectados. De esta forma, se puede determinar la Selectividad o el rendimiento de la reacción respecto a los productos deseados, que hace referencia a la cantidad relativa de FAEE producida, componentes exclusivos del Biodiésel convencional, y de los monoglicéridos (MG), obtenidos por catálisis enzimática, (FAEE+MG), que son los componentes útiles como biocombustibles, denominado y patentado como Ecodiésel, ya que poseen un peso molecular algo mayor o equivalente al cetano. Estos productos de la reacción son los que presentan propiedades químico-físicas similares al cetano, que les hacen más útiles como biocombustibles, dado que presentan valores de viscosidad más próximos al cetano y demás hidrocarburos que constituyen el diésel convencional. La Conversión contempla la cantidad total de triglicéridos transformados, lo que incluye los FAEE+MG y los diglicéridos DG; (FAEE+MG +DG) también detectados en el cromatograma, respecto a los triglicéridos que no han reaccionado (TG), determinados por Cromatografía de Gases, por diferencia respecto al cetano (hexadecano) empleado como patrón interno. Los DG y TG aunque tienen valores de viscosidad más elevados, son materiales que pueden conceptualmente ser también empleados, en mezclas, como un biocombustible, ya que sus propiedades químico-físicas en general, y con la única excepción de la viscosidad, así lo permiten.

Por tanto, es completamente imprescindible realizar los análisis correspondientes a la viscosidad cinemática de todos los productos de reacción obtenidos, y su contraste con los valores de conversión y rendimiento de los procesos estudiados, ya que este parámetro estará estrechamente relacionado con los valores de conversión y rendimiento.

2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

En este capítulo se describen, en primer lugar, los métodos analíticos utilizados en la caracterización de las materias primas y de cada uno de los productos de las reacciones. Además, se detallan tanto los instrumentos y aparatos utilizados, como las metodologías seguidas para la realización de todos los ensayos llevados a cabo. Se describe el método cromatográfico utilizado, así como la metodología aplicada para la determinación de la viscosidad cinemática de todos los productos de reacción.

Es importante destacar la importancia de la determinación de la viscosidad cinemática de cada una de las muestras de biodiésel obtenidos, al ser éste el parámetro que en última instancia permite que el combustible sea utilizable en motores diésel convencionales actuales, ya que estos están diseñados para operar con combustibles con un rango concreto de viscosidades cinemáticas, entre 2 y 4.5 cSt en Europa (en USA en el rango 2-6 cSt). Si se utilizan biocombustibles con viscosidad superior se producen pérdidas de potencia y una mala combustión, mientras que si la viscosidad es excesivamente baja, se genera una mezcla demasiado rica en combustible y la combustión es deficiente, emitiendo a la atmósfera hidrocarburos contaminantes, que por interacción con el oxígeno atmosférico generan ozono.

Para el estudio de la reacción de transesterificación parcial se ha utilizado como materia prima estándar fuente de triglicéridos, el aceite de girasol comercial. Este aceite de girasol tiene una viscosidad de partida de 32.0 cSt, que tras experimentar una reacción de transesterificación completa con metanol y catálisis básica (NaOH, por ejemplo), se obtiene una mezcla de FAMES, es decir biodiésel convencional (según normativa EN 14214), cuya viscosidad se reduce hasta 3.5-4 cSt. Aplicando catálisis enzimática, que conducen a reacciones de transesterificación parcial, la viscosidad se reduce hasta 8-14 cSt, suficiente si se utiliza en mezcla (en diferentes porcentajes) con el diésel fósil, y que contiene proporciones variables de FAEE, MG, DG y TG, que son necesarias determinar para evaluar adecuadamente el proceso enzimático.

2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

En este capítulo se describen también los diferentes parámetros utilizados en la caracterización de la materia prima empleada (densidad, humedad y el grado de acidez) y de los productos de reacción obtenidos, principalmente la viscosidad cinemática y la determinación del contenido de los compuestos presentes en las muestras de biocombustible (Ecodiésel) obtenido (ésteres alquílicos, monoglicéridos, diglicéridos, triglicéridos y posible glicerol libre, respectivamente). La combinación de estos parámetros determinará definitivamente el índice de cetano cuando esta mezcla se emplea como biocombustible (Rocabruno-Valdes, Ramirez-Verduzco, & Hernandez, 2015).

2.1.1. METODOS DE ANÁLISIS DE LAS MATERIAS PRIMAS

Las propiedades físicas y químicas de los biocombustibles están relacionadas con la composición de las materias primas de origen, pudiendo variar sustancialmente de una materia prima a otra, es decir, del aceite vegetal utilizado, que contienen los triglicéridos que se necesitan para obtener los ésteres alquílicos. Las principales materias primas usadas son los aceites vegetales convencionales: colza, girasol, soja, palma y coco. En este estudio se emplea aceite de girasol, ya que es la materia prima más adecuada en nuestro entorno y en extensas regiones del Mediterráneo.

a) Determinación de la Humedad.

La determinación de la humedad es muy importante en la catálisis enzimática, pues suele afectar negativamente al rendimiento de las enzimas, así pues, es importante determinar dicho contenido en el aceite de partida y comprobar su relación con el rendimiento (Cristobal Verdugo et al., 2011; C. Verdugo et al., 2010) .

Se han determinado mediante un ensayo por el cual la muestra se calienta en una estufa a vacío hasta que la pesada es constante. Para ello, se tara un vaso de precipitado, bien seco; se procede a su pesada y se añaden entre 35 - 45 g de muestra. Se introduce en un dispositivo que permite calentar a vacío, manteniendo una temperatura constante a 100 °C durante 24 horas. Pasado este tiempo y una vez frío, se repite la pesada. Se continúa con este procedimiento hasta obtener una pesada constante. El contenido en humedad se obtiene de la diferencia de pesos y se expresa en tanto por ciento.

También se ha determinado la cantidad de agua (%) aplicando el método Karl-Fischer, utilizando un aparato titulador modelo CRISON TitroMatric 2S-2B.



Figura 2.1. Valorador automático TitroMatic 2S 2B ("Karl-Fischer") empleado para determinar el contenido en agua del aceite vegetal usado como materia prima.

b) DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE O GRADO DE ACIDEZ

La determinación del índice o grado de acidez es una medida del contenido de ácidos grasos libres en el aceite de partida. Dicha medida es de gran importancia en la producción de biodiésel convencional, ya que el procedimiento de catálisis básica utilizado, hace que en presencia de ácidos libres se produzca la desactivación del catalizador y la formación de jabones. En el caso del Ecodiésel es importante controlar este parámetro en el aceite que se utiliza como materia prima, pues puede afectar el rendimiento del biocatalizador. El índice hace referencia al peso en mg de KOH empleados para neutralizar los ácidos grasos presentes en un gramo de muestra. El grado hace referencia al porcentaje en peso de estos ácidos grasos libres.

Para determinar el grado de acidez se ha seguido el procedimiento descrito en la norma ISO 660. Para ello se pesan entre 2.5 - 10 g de muestra, dependiendo de la

2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

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

c) DENSIDAD.

La densidad es una de las propiedades más importantes de los combustibles, ya que los sistemas de inyección, bombas e inyectores deben suministrar la cantidad de combustible con precisión para proporcionar la combustión adecuada (Dzida & Prusakiewicz, 2008).

La densidad del biodiésel depende del contenido en ésteres y de la cantidad remanente de alcohol, por lo tanto, esta propiedad viene determinada fundamentalmente por el aceite vegetal elegido y, en cierta medida, por las etapas de purificación aplicadas (Predojevic, 2008).

Se determina la masa de la unidad de volumen, expresada en gramos por centímetro cúbico, a una temperatura dada. La temperatura requiere un estricto control, ya que la densidad de las materias grasas varía aproximadamente 0.00068 unidades por grado. La determinación se realizará con un picnómetro normal de 10 ml, a 25 °C de temperatura, mediante el cociente del peso del aceite por 10, obteniéndose así la densidad, d , en g/ml.

2.1.2. DISEÑO EXPERIMENTAL: REACCIONES DE ETANOLISIS.

Para la determinación de la eficiencia de los sistemas biocatalíticos ensayados, se llevan a cabo reacciones de transesterificación enzimáticas de aceite de girasol con etanol para la obtención de diferentes mezclas de FAEE, MG y DG, aplicables como Biocombustibles. Estas reacciones se efectúan en un reactor de tanque agitado ("Batch") y a presión atmosférica. Se estudian diferentes parámetros que afectan a la reacción y su valor óptimo, un rango de temperaturas, variación en la relación molar aceite/alcohol (etanol), cantidad o peso del sistema biocatalítico enzimático, pH del medio de reacción e influencia del agua en la reacción. Se comprobará la robustez y estabilidad de dichos sistemas enzimáticos, al repetir varios ciclos de reacciones. Igualmente, se seguirá la evolución del rendimiento de la reacción en el tiempo.

La preparación del sistema experimental para los ensayos de determinación de la eficiencia de los sistemas enzimáticos comienza con la pesada de 0.005 mol de materia grasa de partida, cuyo peso dependerá de la composición de ácidos grasos del material. En el caso del aceite de girasol comercial utilizado, se ha tomado como estándar que 0.005 mol = 6 ml de aceite, depositando la muestra directamente en un matraz de fondo redondo de dos bocas de 50 ml de capacidad, o en un tubo "falcon", donde previamente se obtuvo el extracto enzimático del cultivo microbiano, como se muestra en la **Figura 2.2**.

En dicho matraz (o en el tubo "falcon") se llevan a cabo directamente las reacciones de transesterificación para la determinación de la eficiencia de los biocatalizadores. Así, una vez se tiene la materia grasa en el matraz, se adiciona la correspondiente cantidad de etanol absoluto (Panreac, calidad p. a., y riqueza 99.98 %), que dependerá de la relación molar estudiada y la cantidad necesaria de una disolución acuosa 10 N de NaOH en el medio de reacción. Cuando el matraz contenga todos los reactivos indicados, se introduce durante el tiempo necesario en un baño de

2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

agua termostatzado para que se alcance la temperatura deseada de trabajo. Se pesa y añade rápidamente la cantidad seleccionada del sistema biocatalítico estudiado al matraz de reacción, comenzando en este mismo instante la agitación de la mezcla y tomándose como tiempo de inicio de la reacción. Las reacciones tienen lugar en diferentes condiciones controladas de agitación y temperatura, mantenidas con un agitador magnético convencional y un baño termostático respectivamente, como se muestra en la **Figura 2.2**. El progreso de la reacción se sigue cromatográficamente, durante el tiempo necesario, así se estima la evolución del rendimiento de la reacción a lo largo del tiempo de reacción, tomando muestras directamente del matraz de reacción para su posterior análisis.

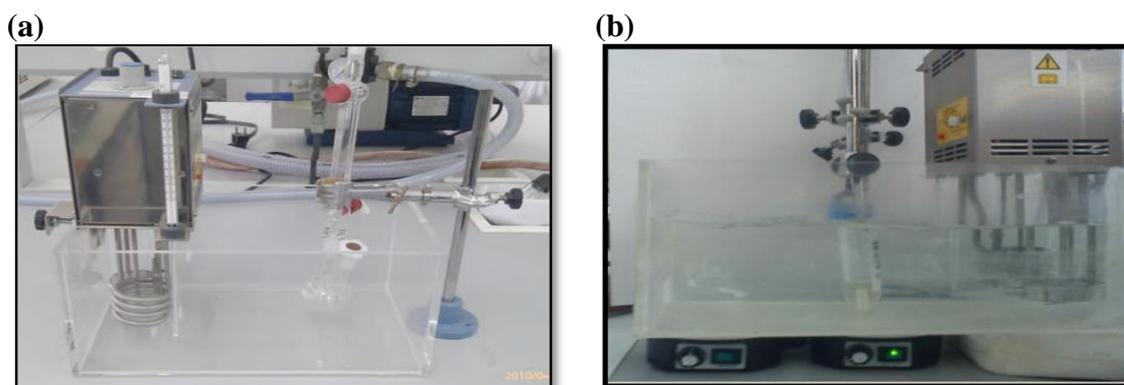


Figura 2.2. Dispositivo experimental utilizado para llevar a cabo las reacciones de transesterificación enzimática parcial de aceite vegetal para la obtención de Ecodiésel (FAEE y MG) con lipasas comerciales libres o inmovilizadas (a) y con extractos enzimáticos obtenidos a partir de cultivos microbianos (b).

2.1.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE REACCIÓN.

La reacción de transesterificación de aceites y grasas con un alcohol de cadena corta como etanol puede dar lugar a varios productos, por ello es necesario caracterizar esta mezcla, ya que de su composición dependen las propiedades químico-físicas y reológicas que presenta el biocombustible obtenido. Así, un alto contenido en diglicéridos indica que la reacción ha avanzado poco, ya que son productos intermedios de la transesterificación total. Por el contrario, un alto contenido en monoglicéridos y ésteres etílicos, desvelan un gran avance de la extensión de la reacción y potencialmente unas buenas propiedades para el uso de la mezcla como biocombustible, ya que los altos contenidos en ésteres y monoglicéridos son responsables de que la mezcla presente bajas viscosidades y mejores propiedades de combustión, así como de sus propiedades lubricantes. De hecho la viscosidad cabe esperar varíe en el orden de sus pesos moleculares, $TG > DG > MG \geq FAEE \geq FAME \approx$ Diésel fósil.

a) ENSAYO DE PRESENCIA DE JABONES

La comprobación de la presencia de jabones se lleva a cabo mediante un ensayo cualitativo. Para ello, se toman unos 2.5 - 5 g de muestra y se le añade aproximadamente la misma cantidad en volumen de acetona acuosa al 1 % y unas gotas de disolución de azul de bromofenol y se agita violentamente. Una tonalidad azul-violeta indica la presencia de jabones, y una tonalidad amarillo-verdosa indica su ausencia. De esta manera puede detectarse, o descartarse, la presencia de jabones en los biocombustibles obtenidos, que se forman durante la reacción de transesterificación en medio alcalino, por reacción de los ácidos grasos libres presentes en los aceites investigados, con los metales alcalinos Na o K, empleados como catalizadores.

b) DETERMINACIÓN DE LA VISCOSIDAD CINEMÁTICA

La viscosidad es el parámetro esencial a modificar, en una reacción de transesterificación de aceites para obtener biodiésel u otro biocombustible, ya que para poder utilizar el biocombustible en los actuales motores Diésel, sin modificar, es necesario que la viscosidad del biocombustible, o la mezcla final diésel-biodiésel, se encuentre en un rango de 2.5 - 5 mm²/s (UNE EN ISO 3104). Por tanto, la correcta determinación de la viscosidad es crítica para evaluar la calidad del biocombustible obtenido, ya que unos valores inadecuados de este parámetro pueden afectar decisivamente al buen funcionamiento del motor.

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

La viscosidad se ha medido en un viscosímetro capilar Ostwald-Cannon-Fenske (Proton Routine Viscometer 33200, size 150), determinando el tiempo necesario para que un cierto volumen de líquido pase entre dos puntos marcados en el instrumento, colocado en posición vertical, (**Figura 2.3**). Esto constituye una medida de la amortiguación que sufre el flujo del líquido, como consecuencia del frotamiento interno de sus moléculas, en función de su viscosidad, siempre que se mantengan constantes las variables que influyen en el proceso, principalmente la temperatura. A

2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

partir del tiempo de flujo (t), expresado en segundos, se obtiene la viscosidad cinemática expresada en centistokes, $\nu = C \cdot t$. Donde C es la constante de calibración del sistema de medida en mm^2/s^2 , que viene dada por el fabricante del aparato ($0.040350 \text{ mm}^2/\text{s}^2$ a $40 \text{ }^\circ\text{C}$, en este caso).

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

Todas las medidas se han llevado a cabo por duplicado y se presentan como la media de ambas, comprobándose que no exista una variación mayor del 0.35 % entre medidas, como exige la norma UNE 55-105-73. (Escobar-Nino et al., 2014; C. Luna et al., 2013; C. Luna, Verdugo, et al., 2014a, 2014b; C. Luna, Verdugo, et al., 2014d; D. Luna et al., 2012; Cristobal Verdugo et al., 2011).

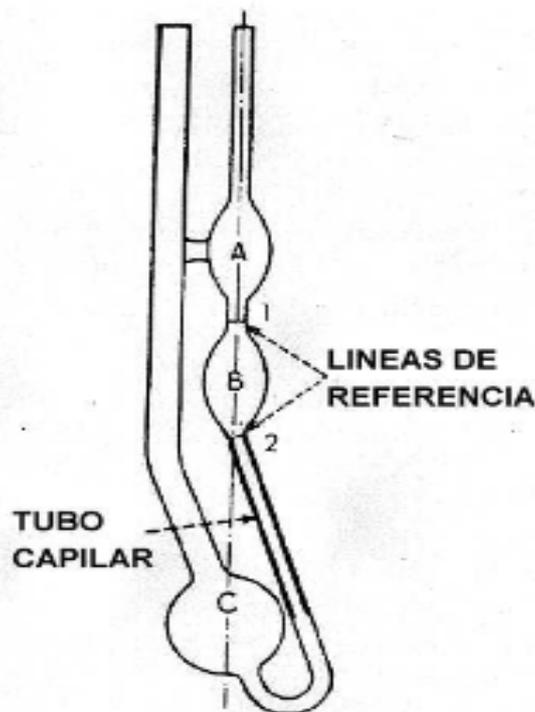


Figura 2.3. Viscosímetro de Ostwald-Cannon-Fenske.

c) DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE FAMES, FAEs Y GLICÉRIDOS EN LOS PRODUCTOS DE REACCIÓN MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE GASES.

La determinación del contenido de ésteres etílicos y glicéridos en las muestras de biodiésel se ha realizado por un método cromatográfico puesto a punto en anteriores publicaciones (Escobar-Nino et al., 2014; C. Luna et al., 2013; C. Luna, Verdugo, et al., 2014a, 2014b; C. Luna, Verdugo, et al., 2014d; D. Luna et al., 2012; Cristobal Verdugo et al., 2011). Se ha utilizado un cromatógrafo de gases Varian 430 GC Gas Chromatograph (**Figura 2.4**), conectado a una columna capilar HT5 (25 m x 0.32 mm I.D x 0.1 μ m, SGE, Supelco) Aldrich Chemie, con un detector de ionización por llama (FID) e inyección "*splitless*". Este método consiste básicamente en una modificación e integración de dos métodos oficiales, UNE EN ISO 14103 (ésteres) y

2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

UNE EN ISO 14105 (glicéridos), para cuantificar el contenido de glicerol, ésteres etílicos y glicéridos (mono-, di- y triglicéridos), respectivamente. Las condiciones cromatográficas usadas fueron las indicadas en la **Tabla 2.2**.



Figura 2.4. Cromatógrafo Varian 430 GC Gas Chromatograph, utilizado para el análisis de la composición del biocombustible.

Para identificar los componentes más característicos de los biocombustibles obtenidos por alcoholisis selectiva, así como para comparar sus propiedades reológicas, se utilizaron varios patrones comerciales de referencia para FAME, FAEE, MG y TG, como se muestra en la **Figura 2.5.**, (Escobar-Nino et al., 2014; C. Luna et al., 2013; C. Luna, Verdugo, et al., 2014a, 2014b; C. Luna, Verdugo, et al., 2014d; D. Luna et al., 2012; Cristobal Verdugo et al., 2011). Aquí también se incluye una muestra representativa de monoglicéridos de aceite de girasol, que se logra fácilmente mediante la sustitución de metanol o etanol por glicerol, en un proceso de alcoholisis convencional, con KOH como catalizador homogéneo, siguiendo condiciones experimentales estándar de reacción.

2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Tabla 2.2. Condiciones de operación empleadas en la determinación cromatográfica de ésteres etílicos y glicéridos en las diferentes reacciones estudiadas.

Gas portador	Helio, flujo 1.5 mL/min
Modo Inyección	<i>Splitless</i>
Temperatura Inyector	350 °C
Temperatura Detector	400 °C
Programa térmico	Desde 60 °C hasta 200 °C a una velocidad de 7 °C/min, seguido de otra rampa desde 200 °C hasta 360 °C a una velocidad de 15 °C/min, manteniendo los 360°C durante 10 minutos.

Aquí podemos ver que los diferentes ésteres de ácidos grasos (FAEs), que componen el perfil lipídico del aceite de girasol, muestran tiempos de retención (RT) ligeramente superiores al cetano (n-hexadecano), utilizado como patrón interno. Así, en este caso, mientras que el RT del cetano es de unos 10 minutos, todos los RT de FAEs aparecen en el rango de 16 a 26 minutos. Estos se componen de ésteres de metilo, etilo y glicerol (que constituyen los MGs) de palmítico, esteárico, linoléico y oléico, respectivamente.

Así, los derivados del ácido palmítico (C16: 0) se agrupan en un rango estrecho de RT, de 16 a 17 minutos, mientras los derivados de los ácidos oléico (C18: 1) y linoléico (C18: 2) se agrupan en RT de 19 a 21 minutos, con la excepción del éster glicérico del ácido oleico, o lo que es lo mismo, del MG del ácido oleico, que tiene un comportamiento algo diferente, con un RT = 26 minutos. Así, de acuerdo con la composición del aceite de girasol, que contiene aproximadamente un 19 % de oleico, en el caso de una reacción selectiva ideal, la cantidad de MG del oleico supone como máximo $19 \times (33/100) = 6.3$ % del total.

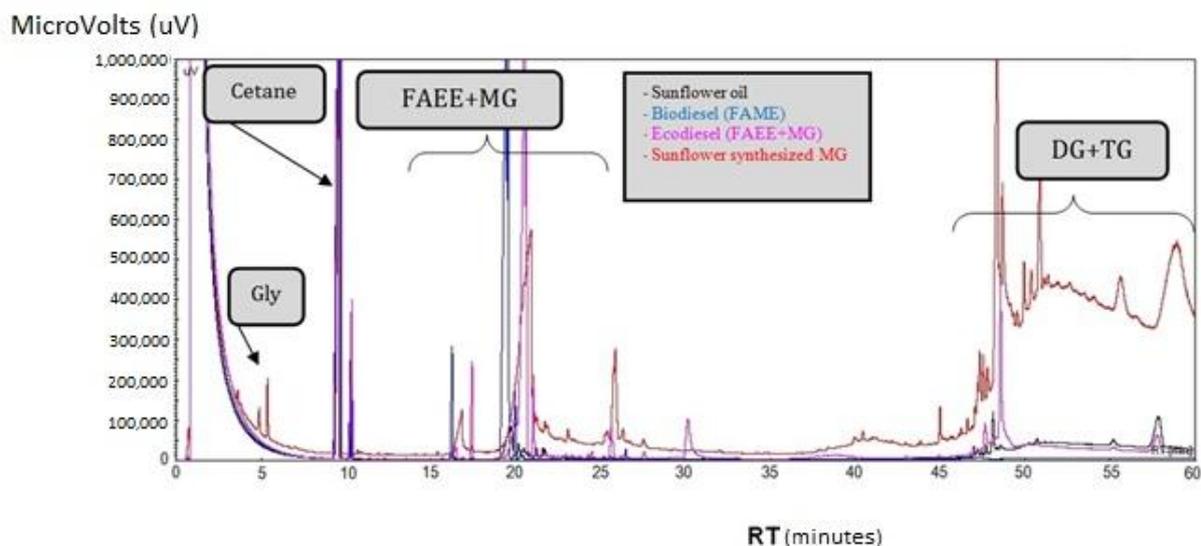
2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Es decir, en el caso de una conversión selectiva ideal, en la que no estuviesen presentes ni TG ni DG, sólo el 6 % de los compuestos presentarían un comportamiento respecto a la viscosidad, ligeramente diferenciados del de los FAME o FAEE (**Figura 2.5**). En cualquier caso, en una mezcla de estos biocarburantes con gasóleo en un B20, o superiores los valores de viscosidad se reducen lo suficiente como para cumplir con la referencia actualmente requerida para los valores de viscosidad (2.5-5,0 cSt) en la normativa vigente.

El RT de la glicerina es de 5 minutos, antes del cetano. La ausencia de este compuesto en los cromatogramas obtenidos demuestra claramente el carácter selectivo de la reacción de transesterificación estudiada.

En la **Figura 2.5** también se puede observar la presencia de DG con tiempos de retención más elevados, 40-60 minutos, además una parte de ellos no son integrados en el cromatograma, por lo que es necesario la determinación conjunta de DG y TG, mediante el uso de un patrón interno como el cetano. Cabe señalar que la diferencias en los valores de RT entre MG y DG son superiores a las existentes entre MG y FAME o FAEE, como es de esperar por las diferencias entre sus correspondientes pesos moleculares. Al mismo tiempo, está claro que los FAMEs, FAEEs y MGs muestran valores de RT algo mayores que el cetano, pero dentro del rango de pesos moleculares de los hidrocarburos que componen el diésel fósil convencional (**Figura 2.6.**), lo que permite considerar que comparten similares propiedades reológicas y químico-físicas, que permitirán el uso de los FAEs puros o en mezclas con los hidrocarburos que constituyen el diésel.

2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL



Retention Time (RT/min)	Peak
0-7	Solvent (ethanol + dichloromethane 50:50)
5	Glycerol
9-10	Internal Standard (n-hexadecane/ Cetane)
16	Palmitic FAME (16:0)
17	Palmitic MG (16:0)
18	Palmitic FAEE (16:0)
19	Estearic (18:0), Linoleic (18:2), Oleic (18:1) FAME
20	Estearic (18:0), Linoleic (18:2), Oleic (18:1) FAEE Estearic (18:0), Linoleic (18:2) MG
26	Oleic (18:1) MG
40-60	DG + TG

Figura 2.5. Cromatogramas superpuestos del aceite de girasol (negro), y los cromatogramas obtenidos en la alcoholisis de aceite de girasol con metanol (FAME), etanol (FAEE) y glicerol (monoglicéridos, MG) correspondiente al azul, rosa y rojo, respectivamente. La selectividad es definida como el porcentaje de productos de reacción con tiempos de retención (RT <25) compuestos similares a los hidrocarburos que componen el diésel fósil convencional.

2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

En efecto, al considerar el cromatograma de un combustible diésel (**Figura 2.6.**), podemos comprobar que éste se encuentra formado por una mezcla compleja de hidrocarburos en cuyo centro aproximado se encuentra el Cetano. Este hidrocarburo es considerado el “combustible estándar” para los motores de combustión interna, o motores Diésel, por lo que se utiliza su “índice” (en forma de porcentaje) para comprobar la calidad de los combustibles, y presenta un tiempo de retención (RT) que se ubica aproximadamente en la mitad del cromatograma del diésel fósil. Dado que los tiempos de retención de estos hidrocarburos se extienden desde 1 hasta los 25 minutos, utilizaremos como valor de referencia para diferentes biocombustibles (FAME, FAEE, MG), como valor de Selectividad, todos aquellos FAEs que presenten valores de RT coincidentes con los hidrocarburos que forman el Diésel, es decir con RT inferiores a 25 minutos, ya que es de esperar que también presenten propiedades fisicoquímicas y reológicas similares al diésel convencional de origen fósil.

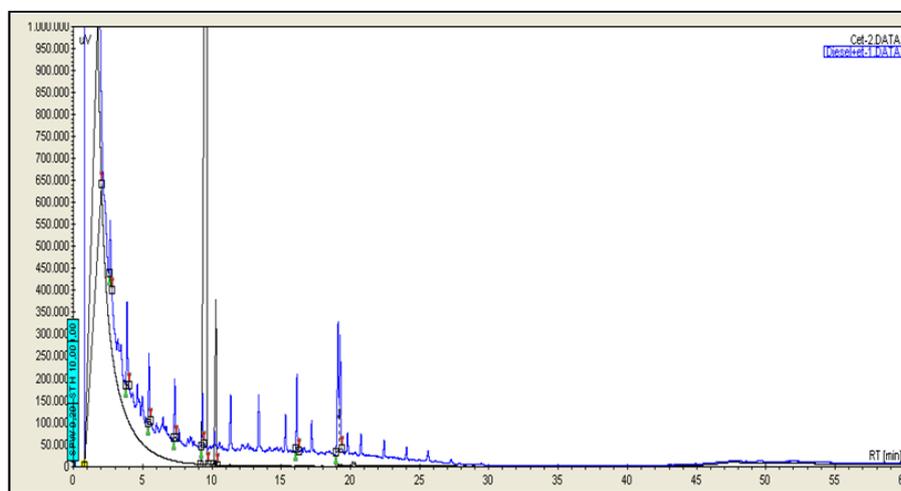


Figura 2.6. Cromatograma obtenido de un combustible diésel en condiciones experimentales idénticas a las empleadas con los biocombustibles.

2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

A efectos de visualizar más claramente la dificultad de detectar cromatográficamente los TG, se muestra la **Figura 2.7**, en la que se puede comprobar que no son detectados por el integrador como picos, sino como una protuberancia a RT 45-60 minutos, como se muestra más nítidamente que en la **Figura 2.5**, en que aparece junto al resto de los productos de reacción.

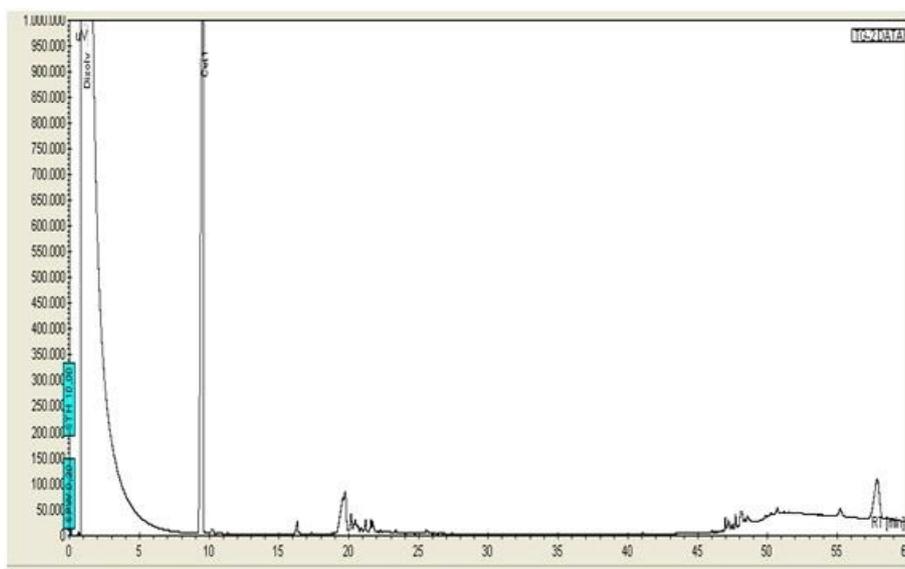


Figura 2.7. Cromatograma del aceite comercial en condiciones experimentales idénticas a las empleadas con los biocombustibles.

En resumen, la metodología experimental de la Cromatografía de Gases aplicada, permite la caracterización de las mezclas de reacción, determinando con gran exactitud la presencia o ausencia de glicerina, lo que determina el grado de selectividad del proceso de obtención del Ecodiésel obtenido, considerando en forma conjunta el contenido de FAEE y MGs, frente al contenido de DG y/o TG, que nos informa del grado de conversión del proceso.

2.2. SISTEMAS BIOCATALÍTICOS EMPLEADOS

2.2.1. LIPOPAN 50 BG

Se trata de una lipasa comercial de bajo coste, Lipopan 50 BG (Novozymes AS, Dinamarca), obtenida a partir de una cepa genética modificada de *Aspergillus niger*, siendo la fuente inicial *Thermomices lanuginosus*. Continuamos estudios previos de esta lipasa comercial (Cristobal Verdugo et al., 2011), que habitualmente se utiliza como emulsionante ("mejorador del pan") en la industria panificadora, como mejora de las características de la masa sin pegajosidad, mejora de la fuerza del gluten y la elasticidad que resulta en una mayor estabilidad de la masa, mejora la estructura de la miga, así como su color más blanco (Moayedallaie, Mirzaei, & Paterson, 2010; Stojceska & Ainsworth, 2008).

Recientemente, debido a su bajo precio se ha investigado su aplicación en diferentes procesos de química fina. (Rodriguez-Contreras, Calafell-Monfort, & Soledad Marques-Calvo, 2012). Donde se emplea como agente de depolimerización enzimático de poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate), un polihidroxicanoato (PHAs), aplicado como polímero de carácter biocompatible y biodegradable empleado en diferentes procesos comerciales (Lee, Park, & Lee, 2010; Sinkuniene, Bendikiene, & Juodka, 2011).

No obstante, nunca hasta ahora se ha aplicado esta lipasa como biocatalizador en la producción de biodiésel, así que se ha evaluado como tal en este proceso con el fin de mejorar la viabilidad económica de la producción de biocombustibles. Los resultados obtenidos, en cuanto a los parámetros más influyentes en el rendimiento y sus valores óptimos, servirán de base y como referencia para continuar otros estudios y comparar resultados, con otras lipasas e incluso para desarrollar propuestas de

2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

inmovilización. Servirá como referencia frente a la variabilidad esperada en las lipasas provenientes de los extractos obtenidos a partir de cepas silvestres recolectadas en ambientes lipófilos.

Esta lipasa, cedida por Novozymes, es producida por fermentación sumergida del microorganismo genéticamente modificado *Aspergillus oryzae*, con una actividad de 50 KLU/g. Siendo las KLU Kilounidades de lipasa (hidrólisis de trioleína) por gramo de soporte.

2.2.2. CALB (*Candida antarctica* tipo B).

En este apartado se estudiará y evaluará la lipasa proveniente de la levadura *Candida antarctica* tipo B (CALB), bastante utilizada en la producción enzimática de biodiésel, por este motivo se contrastan resultados en sus diversas formas, tanto inmovilizada comercial, libre purificada comercial, así como lipasa comercial inmovilizada en laboratorio, incluso extractos enzimáticos lipasídicos obtenidos a partir de cultivos líquidos de cepas estándares de la misma, obtenidos en la CECT (Colección Española de Cultivos Tipo).

a) NOVOZYM 435 (N435).

El objetivo del presente estudio es evaluar Novozym 435, una lipasa comercial *Aspergillus niger* e inmovilizada sobre una resina acrílica macroporosa (Xu, Nordblad, & Woodley, 2012).

Novozym 435, se ha utilizado frecuentemente en la producción de biodiésel convencional, así como en otros procesos de transesterificación o interesterificación (Yara-Varon et al., 2012) y en la producción de biodiésel catalizada por lipasa, por isopropanolisis de aceite de soja (Chang, Chen, Chang, Wu, & Shieh, 2009). A este respecto, Novozym 435 se ha descrito también recientemente en la biosíntesis, catalizada por lipasa, simultánea de biodiésel y glicerol carbonato, mediante el uso de carbonato de dimetilo, como aceptor de acilo para obtener un biocombustible, similar al biodiésel, sin generación de glicerol (Min & Lee, 2011). Por lo tanto, en este estudio, se pretende poner en valor el comportamiento 1,3 selectivo de estas lipasas comerciales, para hacer factible la producción rentable de biocombustibles alternativos (Calero et al., 2015), utilizando un enfoque enzimático.

2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Novozym 435, la lipasa B de *Candida antarctica* (CALB) fue proporcionada por Novozymes. Esta lipasa comercial es producida por fermentación sumergida del microorganismo *Aspergillus niger* modificado genéticamente y se adsorbe en una resina acrílica macroporosa. La actividad específica de esta lipasa comercial en la hidrólisis de tributirina era de 3000 U/ g.

b) CALB INMOVILIZADA POR ADSORCIÓN FÍSICA

En este apartado se procede a la inmovilización de una lipasa CALB comercial (CALB, Lypozime CALB L, de Novozymes de España, S. A.), siguiendo la metodología descrita por (Gascon, 2014). Empleando como soporte inorgánico un materiales Mesoporosos Organosilíceos Ordenados (PMO) y sobre material silíceo amorfo MS-3030 funcionalizado con grupos octilo mediante el empleo de compuestos organosilanos. Empleando este sistema biocatalítico se evaluará el rendimiento en la reacción de transesterificación de aceite de girasol con etanol para obtener Ecodiésel (FAEE + MG). También se comprobará la evolución del rendimiento de esta reacción a lo largo del tiempo de reacción y la vigorosidad del sistema biocatalítico, al efectuarse varios ciclos de reacción sucesivos.

I. Síntesis del material organosilíceo PMO:

Se han sintetizado varios materiales Mesoporosos Organosilíceos Ordenados (PMO). Para optimizar el procedimiento de síntesis se ha variado el orden de adición de los reactivos, así como la temperatura de las distintas etapas. Después de consultar numerosa bibliografía acerca de la síntesis de PMO (Guo et al., 2003; Hoffmann, Cornelius, Morell, & Froeba, 2006; Muth, Schellbach, & Froba, 2001; Na et al., 2010; Ren, Zhang, & Suo, 2002; Serra, Mayoral, Sakamoto, Blanco, & Diaz, 2008; Zhai, Kim, &

2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Ha, 2008) y probar distintas metodologías, finalmente el protocolo más adecuado se basa en la síntesis de Qiao (Qiao et al., 2006).

Se disuelven 3,19 g de P123 mediante agitación lenta en 126,84 mL de disolución de HCl 0,174 M en un bote de teflón. Una vez disuelto el surfactante se añaden 9,38 g de KCl (Guo et al., 2003). Cuando la disolución resultante se ha homogeneizado, se calienta en un baño de agua termostaticado hasta una temperatura constante de 40°C. Se añade de una sola vez y con agitación rápida 3,97 mL del bis-alcoxisilano funcional BTME. La composición molar de reactivos es de 0,036 P123/ 8,280 KCl/ 1,434 HCl/ 458,723 H₂O/ 1 BTME. La disolución se mantiene a 40°C y con agitación media durante 24 horas. Se envejece la misma durante otras 24 horas a 100°C en la estufa. Posteriormente, el producto resultante se filtra, se lava con etanol y se seca a temperatura ambiente. El surfactante se elimina mediante extracción con etanol/HCl a reflujo. El procedimiento de síntesis seguido queda esquematizado en la siguiente **Figura 2.8**.

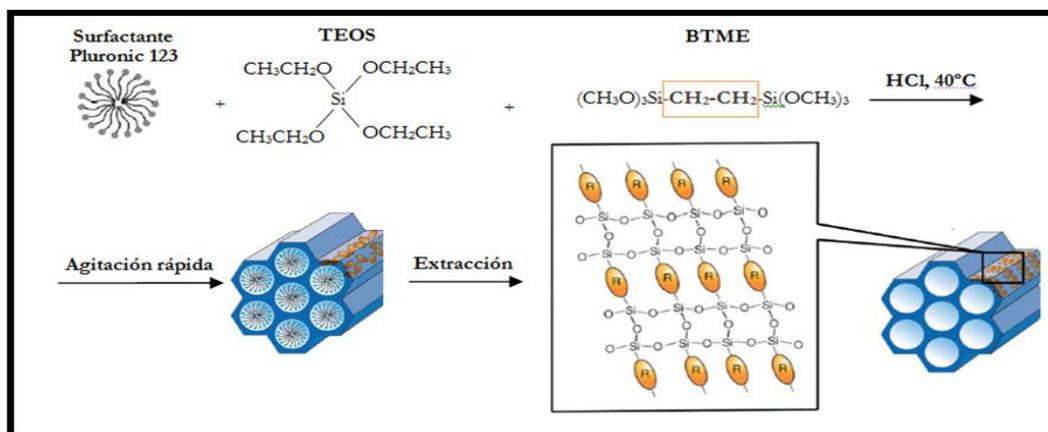


Figura 2.8. Esquema del procedimiento de síntesis de PMOs donde las unidades orgánicas, correspondientes al etileno (-CH₂-CH₂-), se anclan dentro de las paredes del poro (Gascon, 2014).

2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

II. Tratamientos de eliminación del surfactante: Extracción con etanol a reflujo.

Este procedimiento es más suave que el anterior y permite eliminar las moléculas del surfactante sin afectar a la estructura de los materiales organosilíceos. Para ello se añaden en un matraz de fondo redondo con capacidad de 500 mL, 1,5 g de material, 205 mL de etanol y 20 mL de HCl concentrado, manteniendo la mezcla a reflujo durante 24 horas. Se añade una pequeña cantidad de HCl para mejorar el grado de condensación de la estructura y minimizar los defectos (Wan & Zhao, 2007). El material se recoge mediante filtración a vacío y lavado con etanol. El sólido resultante se seca a temperatura ambiente durante 24 horas.

III. Anclaje de grupos octilo sobre sílice amorfa MS-3030.

La funcionalización del material silíceo amorfo MS-3030 se lleva a cabo mediante el método de anclaje (Feng et al., 1997) por reacción de silanización de los grupos silanol superficiales con el organosilano octil-trietoxisilano, OTES, de acuerdo con el esquema mostrado en la **Figura 2.9**.

Previamente a la reacción de silanización se realiza la desgasificación de 5 g de muestra sometiéndola a vacío en corriente de nitrógeno a la temperatura de 80 °C durante 20 horas (R. M. Blanco, Terreros, Fernandez-Perez, Otero, & Diaz-Gonzalez, 2004).

La reacción de anclaje se realiza suspendiendo la sílice en 100 mL de tolueno seco, se añade a la dispersión el precursor orgánico (OTES) en exceso (25 g), y se mantiene a reflujo y en corriente de nitrógeno durante 48 horas a 100 °C. El sólido se recupera por filtración, se lava con tolueno seco para eliminar el exceso de reactivo y con acetona para secarlo. Finalmente, se deja secar a temperatura ambiente durante un día.

2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

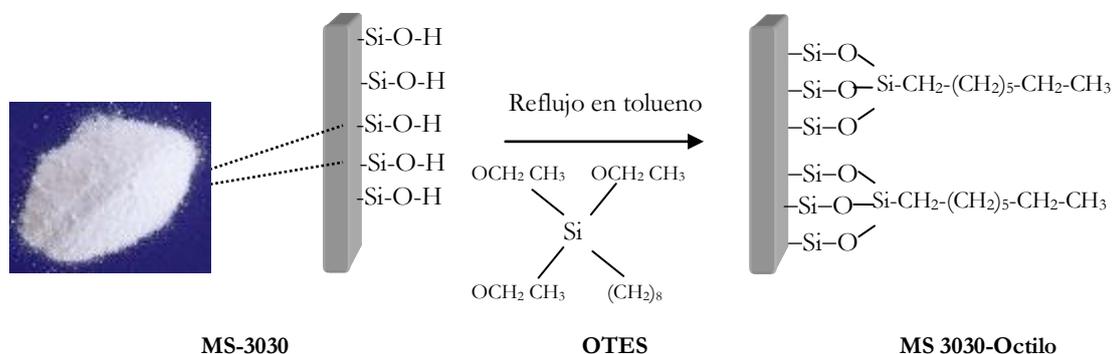


Figura 2.9. Funcionalización del material silíceo amorfo comercial MS-3030 mediante anclaje. El grupo orgánico incorporado es el octilo. (Gascon, 2014)

IV. Inmovilización de lipasa en PMO /MS-3030 Octilo.

El protocolo de inmovilización de la lipasa de *Candida antarctica* B sobre PMO o MS-3030-Octilo es similar al descrito previamente por Blanco y colaboradores (R. M. Blanco et al., 2004; Serra et al., 2008). La lipasa de *C. antártica* B al tener un dominio fuertemente hidrofóbico en su superficie puede interactuar adsorbiéndose sobre soportes con superficies y paredes hidrofóbicas como los PMO.

El procedimiento de inmovilización de lipasa es el siguiente:

- Se pesa una determinada cantidad de PMO o MS-3030-Octilo en un bote de plástico, se humedece con etanol seco (manteniendo la relación de 0,5 mL de etanol/100 mg de sólido) y se tapa (Rosa M. Blanco, Terreros, Munoz, & Serra, 2007).
- Se prepara un volumen fijo de disolución de enzima, considerando que la carga enzimática deseada es de 400 mg de lipasa por gramo de soporte y que el extracto de lipasa comercial tiene una concentración determinada por análisis de Bradford de 5,9 mg de enzima por mL de extracto. La disolución de enzima

2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

está compuesta por el volumen necesario del extracto de lipasa comercial para conseguir la carga enzimática y por disolución del tampón correspondiente 50 mM a pH 5,0 hasta completar el volumen total fijado.

- Se separan unos mililitros de la disolución de enzima y se mide su actividad tres veces. A esta disolución se la denomina blanco.
- Se suspende el volumen fijado de la disolución de enzima sobre el soporte. La suspensión resultante se tapa y se mantiene en agitación en un agitador de rodillos, a baja velocidad para evitar la rotura del material.

En la **Tabla 2.3** se muestran el volumen de etanol necesario para cada tipo de soporte, así como, los volúmenes de extracto de lipasa y tampón requeridos para preparar la disolución enzimática.

V. Determinación de la actividad de lipasa.

La obtención de los datos de cantidad inmovilizada en PMO se ha realizado mediante experimentos en discontinuo. Para cada ensayo se cogieron alícuotas del blanco, la suspensión y el sobrenadante periódicamente para comprobar la incorporación de la enzima al soporte. Sus actividades se determinaron mediante el análisis espectrofotométrico de la hidrólisis de pNPA en un espectrofotómetro Agilent 8453 UV-Vis a 348 nm. Este equipo tiene un dispositivo de agitación y termostatación. Se utilizan cubetas de 1 cm de paso óptico.

La pérdida total o hasta valores constantes en la actividad del sobrenadante es indicativa de que toda la enzima posible se ha fijado al soporte, pudiendo finalizar el proceso. A continuación, la suspensión se filtra a vacío, se lava con tampón 200 mM pH

2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

5,0 y se seca con acetona. Una vez seco el biocatalizador obtenido, se recoge y se almacena en la nevera para evitar la pérdida actividad.

Tabla 2.3. Cantidades necesarias para inmovilizar lipasa en PMO o MS-3030-Octilo para una carga enzimática deseada de 400 mg Lipasa/g Soporte.

(Gascon, 2014)

Soporte	m_{soporte} (mg)	V_{etanol} (mL)	$C_{\text{Extracto enzima}}$ (mg/mL)	$V_{\text{Extracto enzima}}$ (mL)	$V_{\text{Tampón}}$ (50 mM, pH 5,0) (mL)	$V_{\text{Disolución enzimática}}$ (mL)
PMO / MS-3030-Octilo	500	2,5	5,9	138,98	66.02	205

VI. Ensayo de actividad de lipasa hacia la hidrólisis de pNPA (p-Nitrofenilacetato).

Este ensayo mide la actividad esterásica inespecífica. Se emplea como método rutinario para monitorizar la inmovilización de la lipasa en un soporte.

Para preparar la disolución de sustrato se añaden gota a gota 80 μL de pNPA 200 mM en acetonitrilo sobre 40 mL de tampón fosfato de sodio 50 mM pH 7,0, con una velocidad de agitación de la mezcla rápida. Esta disolución se almacena en un baño de hielo.

El ensayo de actividad consiste en pipetear 1,9 mL de la disolución de sustrato sobre una cubeta y añadir una alícuota de 50 μL de blanco, suspensión o sobrenadante.

Se toman alícuotas del blanco o de la suspensión homogénea y se añaden directamente a la cubeta para el ensayo. Cuando la concentración de enzima es alta, las alícuotas deben diluirse para obtener velocidades menores y más fácilmente

2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

medibles ($\Delta A/min \approx 0,1$). Para obtener alícuotas de sobrenadante, se toman también alícuotas homogéneas de suspensión que se centrifugan en un tubo de microcentrífuga o eppendorff (13.400 rpm, 75 seg). Si es necesario, estas alícuotas pueden también diluirse en el mismo tampón del que proceden (50 mM pH 5,0).

La alícuota de enzima cataliza la reacción de hidrólisis del pNPA a p-nitrofenol. El p-nitrofenol presenta coloración fuertemente amarilla (su coeficiente de extinción es mucho mayor que el del p-NPA) por lo que es posible registrar por análisis espectrofotométrico la pendiente o el incremento de la absorbancia por minuto, ΔA , tras 3 minutos de ensayo.

Considerando que una unidad de enzima, U , se define como la cantidad de enzima que transforma un μmol de sustrato por minuto, utilizando la **Ecuación 2.1**. se transforma el incremento de absorbancia por minuto (que es el parámetro que mide el aparato) en unidades de actividad de la enzima.

$$A_e \text{ (U/mL)} = \frac{\Delta A \cdot V_T \cdot 1000 \cdot d}{\varepsilon \cdot L \cdot V_M} \quad (2.1)$$

Donde A_e es la actividad enzimática (U/mL), ΔA es el incremento de absorbancia por minuto ($\Delta Abs/min$), V_T se refiere al volumen total en mL añadido en la cubeta (1,90 mL + 0,05 mL), d es la dilución, ε es el coeficiente de extinción molar (a 25°C, $\varepsilon^{348\text{nm}} = 5.150 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), L es la longitud de paso de luz (1 cm), V_M , se refiere al volumen de la alícuota de muestra de blanco, suspensión o sobrenadante añadido a la cubeta (0,05 mL).

2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Conociendo la concentración de enzima en la disolución enzimática, C_e (mg/mL), se calcula la actividad específica en U/mg, mediante la **Ecuación 2.2**:

$$A_e \text{ (U/mg)} = \frac{\Delta A \cdot V_T \cdot 1000 \cdot d}{\varepsilon \cdot L \cdot V_M \cdot C_e} \quad (2.2)$$

VII. Ensayo de actividad de lipasa hacia la hidrólisis de tributirina.

Para determinar la actividad catalítica del biocatalizador se usa como ensayo la actividad hacia la hidrólisis de tributirina (**Figura 2.10**). Dicho método es más específico que el anterior y está basado en la liberación de ácido butírico que se genera al poner en contacto la tributirina y la lipasa.

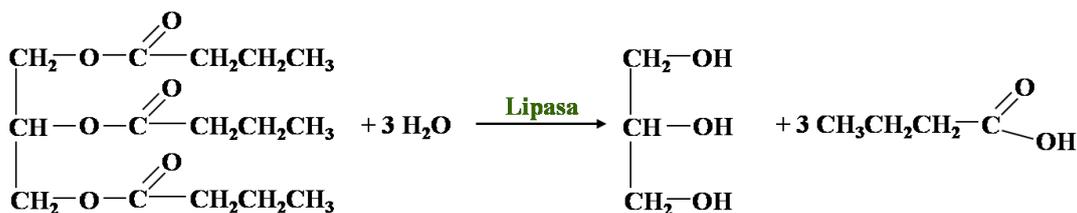


Figura 2.10. Medida de la actividad de lipasa mediante la hidrólisis de tributirina hacia ácido butírico. (Gascon, 2014)

Para monitorizar esta reacción se emplea un pHstato Mettler Toledo DL-50. Se realiza la reacción en una disolución débilmente tamponada a pH 7,0, y la función del pHstato es mantener el pH constante en este valor. Para ello, a medida que se da la reacción y se libera ácido butírico, el pH comienza a disminuir. El aparato libera el volumen de NaOH 100 mM necesario para mantener neutro el pH.

El procedimiento experimental que se ha llevado a cabo en cada reacción ha sido: en un vaso se vertieron 48,5 mL de tampón fosfato potásico 10 mM pH 7,0 y 1,47

2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

mL de tributirina en agitación. A continuación se introduce una masa de biocatalizador conocida, m_B .

La velocidad de adición de sosa, v_{NaOH} , para mantener el pH constante de 7,0 nos da la pendiente de la recta que se corresponde con la velocidad de hidrólisis, y por tanto, la actividad de la enzima. Las unidades de tributirina (U_{TB}) se calculan a partir de la siguiente **Ecuación 2.3**:

$$U_{TB} (U_{TB}/g) = \frac{v_{NaOH} \text{ (mL/min)} \cdot 100 \text{ (}\mu\text{mol/mL)}}{m_B \text{ (g)}} \quad (2.3)$$

La eficiencia catalítica de un biocatalizador inmovilizado se define como la relación actividad/carga, utilizando la **Ecuación 2.4**:

$$\text{Eficiencia catalítica (} U_{TB}/\text{mg Lipasa)} = \frac{U_{TB} / \text{g catalizador}}{\text{Carga inmovilizada (mg Lipasa/g soporte)}} \quad (2.4)$$

De este modo se obtienen y se recogen en la **Tabla 2.4** las siguientes características de carga enzimática y actividad catalítica de los sistemas biocatalíticos preparados.

2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Tabla 2.4. Carga enzimática y actividades catalíticas de los sistemas biocatalíticos preparados. (Gascon, 2014)

Material	Tiempo (h)	Carga enzimática máxima (mg Enz/g biocatalizador)	Actividad (U_{pNPA}/g cat)	Efic. Catal. (U_{pNPA}/mg enz)	Actividad (U_{TB}/g cat)	Efic. Catal. (U_{TB}/mg enz)
PMO (Día 18/02/2015)	5,15	122.1	321.6	2.6	5562.9	45.6
PMO (Día 19/02/2015)	3,5	100.1	331.6	3.3	5365.9	53.6
Octilo-MS3030 (Día 18/02/2015)	5,15	288.1	358.2	1.2	10335.6	35.9
Octilo-MS3030 (Día 19/02/2015)	3,5	235.8	467.6	2.0	7293.1	30.9
	Concentración (mg/mL)	Actividad (U_{pNPA}/g cat)	Actividad (U_{TB}/g cat)			
Lipasa soluble	4	7.3	795583			
Novozyme 435	-	-	1339.1			

U_{pNPA} : Unidades en hidrólisis de p-NPA

U_{TB} : Unidades en hidrólisis de tributirina

d) CEPA ESTÁNDAR DE CANDIDA ANTARCTICA DE LA C.E.C.T.

En este apartado se realizarán diversos estudios encaminados a dilucidar las condiciones óptimas de crecimiento y la capacidad transesterificadora de una cepa estándar adquirida en la C.E.C.T. (Colección Española de Cultivos Tipo) (Kim et al., 2002; Salis, Svensson, Monduzzi, Solinas, & Adlercreutz, 2003).

I. Adquisición de la Cepa de CALB en la CECT.

Tras adquirir la cepa en la CECT, ésta provee la siguiente información recogida en la **tabla 2.5.** (Goto, Sugiyama, & Iizuka, 1969).

2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Tabla 2.5. Características (a) e Historia (b) de la cepa *Pseudozyma antarctica* (CECT 13054).

(a)



History: CECT, 2010 < MUCL, 1989 < CBS, 1983

Isolation source: lake sediment

Isolated in: Lake Vanda. Antarctica

Enzymes: lipase production, non-specific thermostable lipase production

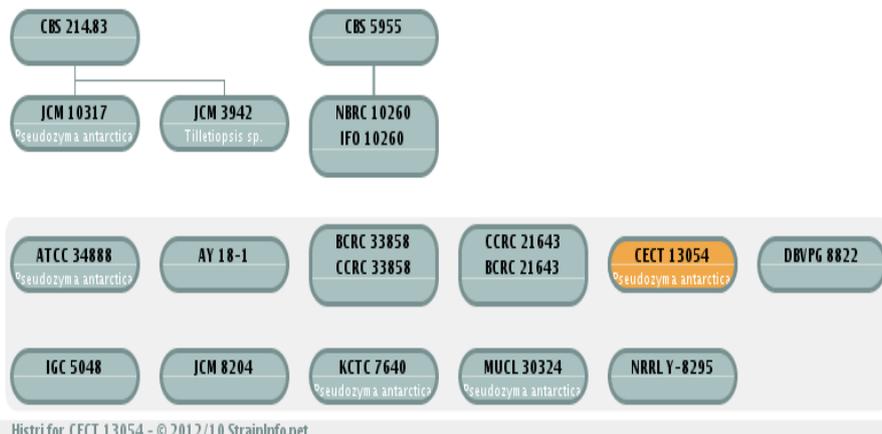
Risk group: 1 (Provisional classification)

Culture conditions (media, temperature, etc.): 54/146, 20°C, 72h, aerobiosis, **AG**

Material transfer agreement (MTA)

Fee: B

(b)



2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

II. Medios de Cultivo:

Se utilizarán los medios de cultivo indicados como óptimos por la CECT en su protocolo (PDA, MYA), además probamos el medio más habitual para levaduras (YPD) y una variación de este (YPL), con lactosa en vez de glucosa. La composición y pH se recoge en la siguiente **Tabla 2.6**. Pueden ser líquidos en forma de caldo o sólidos (si llevan agar en su composición). Tras su preparación, se esterilizan convenientemente en autoclave, a una temperatura de 121°C durante 20 minutos. Tras su tratamiento en autoclave, los medios con agar se conservan en horno para que no solidifiquen antes de ser vertidos en placa. Los medios líquidos se elaboran y almacenan en botes pyrex para su conservación o en matraces (500 ml) para crecimiento de la cepa (100 ml medio). Los medios con agar para generar medios sólidos se vierten en caliente en placas de petri, donde a temperatura ambiente solidificarán (aproximadamente 25 ml de medio por placa).

Para comprobar la actividad lipolítica de esta cepa y para favorecer la secreción de la lipasa, se utilizan medios suplementados con tributirina (0.5 %). La tributirina, al tratarse de un triacilglicerol, es insoluble en agua y para la elaboración del medio fue necesario su tratamiento en baño de ultrasonidos durante al menos 10 minutos a potencia máxima, con el fin de conseguir una emulsión que homogeneiza el medio. Se utilizó un sonicador (Branson SONIFER 250).

III. Inoculación y crecimiento de la cepa en el medio de cultivo.

- **Medio sólido:** sembramos a partir del tubo original en placas petri con PDB (**Figura 2.11**), de ahí se vuelven a sembrar en otras con los diferentes medios de cultivo (MYA, YPD, YPL).

2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

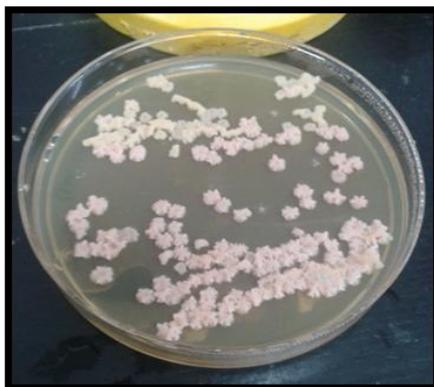


Figura 2.11. Cultivo sólido de CALB en MYA.

- **Medio líquido:** Se pica una colonia en 10 ml de medio líquido en tubos de 50 ml, se deja su tiempo óptimo de cultivo (72 h) en agitación (200 rpm), a 30 °C y se pasa a matraz para su crecimiento en las mismas condiciones, para realizar estudio de crecimiento, capacidad transesterificadora o para obtener su extracto enzimático, mediante diálisis (12 KDa) y liofilización durante 48 h. También se puede acelerar este proceso realizando un "preinóculo líquido" del preinóculo, así tras dejar 24 h creciendo una colonia picada en un tubo de 50 ml, se inyectan 500 µl del mismo en 100 ml de medio en un matraz de 500 ml (**Figura 2.12**).

2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL



Figura 2.12. Cultivos líquidos de CALB en diferentes medios (PDB, MYA, YPD, YPL).

Tabla 2.6. Medios de cultivo utilizados: composición y pH.

"POTATO DEXTROSE AGAR/ BROTH (PDA/PDB)"	<ul style="list-style-type: none"> - Patatas en trozos: 300 g - Dextrosa (glucosa): 20 g - Polvo de agar (sólo para medios sólidos -2%): 15 g - Agua destilada: 1 L - pH = 5,8 ± 0,2
"MALT YEAST AGAR/ BROTH (MYA2)"	<ul style="list-style-type: none"> - Extracto de malta: 20 g - Extracto de levadura: 1 g - Polvo de agar (sólo para medios sólidos -2%): 18 g - Agua destilada: 1 L - pH = 6,2 ± 0,2
"YEAST EXTRACT-PEPTONE-DEXTROSE (YPD) BROTH/ AGAR"	<ul style="list-style-type: none"> - Peptona 20,0 g - Extracto de levadura 10,0 g - Dextrosa (glucosa): 20,0 g - Agar (sólo para medios sólidos -2%) 15,0 g - pH = 6,5 ± 0,2
"YEAST EXTRACT-PEPTONE-LACTOSE (YPL) BROTH/ AGAR"	<ul style="list-style-type: none"> - Peptona 20,0 g - Extracto de levadura 10,0 g - Dextrosa (glucosa): 20,0 g - Agar (sólo para medios sólidos -2%) 15,0 g - pH = 6,5 ± 0,2

2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

IV. Conservación de Cepa congelada.

Tras la correspondiente inoculación de la cepa en alguno de sus medios óptimos, 10 ml del medio (PDB, MYA, YPD o YPL), en un tubo de 50 ml, y dejar crecer su tiempo adecuado (72 h) se centrifuga en las siguientes condiciones (4500 rpm, 4 °C, durante 5 minutos). Se resuspende el pellet en 600 µl de medio + 400 µl de Glicerol (50% v/v) y se pasan a un vial de congelación. Se somete unos segundos al "vortex" y se conservan en congelación, a -20 °C o -80 °C.

V. Medida del Crecimiento de la cepa CALB de la CECT:

Se procede a la toma de muestra (diferente si son medios sin tributirina o con ella) y se mide la Absorbancia a 600 nm, en un espectrofotómetro Beckman DU 640. Lógicamente a mayor crecimiento microbiano en el medio de cultivo líquido, mayor absorbancia.

- **Medios sin Tributirina:** se toma un Blanco (1 ml medio de cultivo) y se toma la muestra: 900 µl medio de cultivo + 100 µl de muestra (obtenida del matraz con cultivo). Tendremos que calcular que estamos diluyendo 10 veces la muestra.
- **Medios con Tributirina:** 1 ml de muestra (del matraz con cultivo) se somete a centrifugación (1300 rpm, 3 min). A continuación, se toma el sobrenadante como blanco. Se preparará la muestra al resuspender el pellet en 1 ml del correspondiente medio (sin TB) mediante un vórtex.

VI. Medida de la Capacidad Transesterificadora de la cepa CALB de la CECT.

Se procede al preinóculo de la muestra picando una colonia del medio sólido en un tubo de 50 ml con 10 ml de cada uno de los medios líquidos a estudiar (PDB, MYA, YPD, YPL) con y sin tributirina. Se deja crecer durante 72 horas, a 30 °C y 200 rpm. Se filtra con un pequeño embudo de plástico,

2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

previamente esterilizado, se recolecta la biomasa (aproximadamente 10 cm de diámetro en todos los casos) y se pasa a los matraces de 500 ml con 100 ml de medio cada uno. Estos se dejan crecer a 30 °C y en agitación constante a 200 rpm, se tomará muestra del cultivo Extracelular (EC) e Intracelular (IC) cada 24 horas (24 h, 48 h, 72 h, 96 h).

En un corcho con hielo se colocan los tubos de cada uno de los medios a estudiar con 4 ml de muestra y se centrifugan: 4°C, 4500 rpm durante 5 minutos. Se toman 900 µl del sobrenadante y se pasan a eppendorfs, éstas serán las muestras de medio extracelular (EC) a un determinado tiempo (24 h, 48 h, etc.).

Los pellets se resuspenden en 4 ml de tampón fosfato 0.05 M y se agitan en el vórtex. Los tubos con pellets resuspendidos se llevan al baño de ultrasonidos (sonicador) de punta fina, aplicándoles 10 pulsos a cada tubo, repitiendo el ciclo 5 veces. Se centrifugan: 4°C, 4500 rpm durante 5 minutos. Tomamos 900 µl del sobrenadante y se pasan a eppendorfs, éstas serán las muestras de medio intracelular (IC) a un determinado t (24 h, 48 h, etc). Se procede a la liofilización de las muestras EC e IC durante 24 h (**Figura 2.13**).

○ **Reacción del p-Nitrofenolpalmitato (p-NPP):**

Siguiendo un método colorimétrico para la determinación de la actividad transesterificadora detallado en la bibliografía (Teng & Xu, 2007). Se prepara la disolución del p-NPP en hexano (0.18875 g de p-NPP en 50 ml de hexano), que se protege de la luz con papel de aluminio y se conserva en congelación (-20 °C) en un tubo falcon. Se añade a cada eppendorf con su extracto liofilizado (EC o IC) 1 ml de p-NPP y 60 µml de etanol absoluto. Se contrastará con un Blanco (1 ml de p N-PPP

2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

y 60 μ ml de etanol absoluto sin extracto). Se pasan todos los eppendorfs a un matraz y se coloca en la cámara de 30°C en agitación durante 8-12 h (se anota número exacto de horas) (Escobar-Nino et al., 2014).

○ **Medida de la cantidad de proteínas ("Bradford")**

Preparamos varias diluciones de proteína BSA (Seroalbúmina bovina) que usaremos como patrón, desde 0 a 12 μ g/ml (**Tabla 2.7**).

Tabla 2.7. Protocolo para la cuantificación de proteínas por el método de Bradford.

BSA (μg/ml)	BSA 0.1 mg/ml (μl)	H₂O (μl)	Bradford (μl)
0	0	800	200
2	20	780	
4	40	760	
6	60	740	
8	80	720	
10	100	700	
12	120	680	

2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

(a)



(b)



Figura 2.13. Proceso de liofilización (a) y Liofilizador VirTis. Gardiner (b)

2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Representamos la gráfica patrón de proteínas: cantidad de BSA (eje de abscisas) frente a la absorbancia obtenida a una longitud de onda de 595 nm (eje de ordenadas).

Tomamos 100 μ l de nuestras muestras IC y EC (cada eppendorf con su correspondiente medio y nº horas), del blanco y lo añadimos a 700 μ l de agua destilada (tenemos que calcular que estamos diluyendo 10 veces la muestra: 1000 /100 μ l; FD = 10). Añadimos 200 μ l del reactivo Bradford a cada tubo y mezclamos bien y con cuidado. Tras un periodo de 5 minutos a 1 hora medimos la D.O. a 595 nm, en un espectrofotómetro Beckman DU 640.

La absorbancia resultante de nuestras muestras se interpola en la curva patrón y se extrapola de ésta al eje de abscisas para conocer la cantidad de proteína contenida en la muestra (IC y EC).

○ **Medida de la capacidad transesterificadora.**

Se añade a cada cubeta 1 ml de NaOH 0.05 M y 25 μ l de muestra, se aplican las siguientes ecuaciones para determinar los siguientes parámetros:

✓ **Actividad Específica (μ moles PNP/h/mg prot)**

Actividad Enzimática Total (AT)

$$= \frac{[Ab(410\text{ nm}) \times \text{Factor Dilución} \times \text{Vol total Muestra (PNPP + EtOH)}]}{[\epsilon \times 1000 (\mu\text{moles})] \div n^{\circ} \text{ horas}} \div [0.9\text{ ml}]$$

Actividad Enzimática Total (AT)

$$= \frac{[Ab(410\text{ nm}) \times 41 \times 1.06\text{ ml}]}{[17600 \times 1000 (\mu\text{moles})] \div 13\text{ horas}} \div [0.9\text{ ml}]$$

2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Se calcula el Factor de Dilución:

$$FD = \frac{25 \mu l \text{ Muestra}}{1 \text{ ml NaOH} + 25 \mu l \text{ Muestra}} = 41$$

✓ **Actividad Enzimática Total (μ moles PNP/h/ml fracción)**

Actividad Enzimática Total (AT)

$$= \frac{[Ab (410 \text{ nm}) \times \text{Factor Dilución} \times \text{Vol total Muestra (PNPP + EtOH)}] \div [\varepsilon \times 1000 (\mu\text{moles})] \div n^{\circ} \text{ horas}}{[0.9 \text{ ml}]}$$

Actividad Enzimática Total (AT)

$$= \frac{[Ab (410 \text{ nm}) \times 41 \times 1.06 \text{ ml}] \div [17600 \times 1000 (\mu\text{moles})] \div 13 \text{ horas}}{[0.9 \text{ ml}]}$$

VII. Obtención de Extractos Enzimáticos de cepas CALB de la CECT: Liofilización con diálisis previa.

Por las pruebas realizadas previamente de optimización concluimos que los medios más idóneos son YPD e YPL (con y sin TB) a las 72 h de crecimiento del cultivo (30 °C y 200 rpm). Colocamos las membranas de diálisis (SIGMA, D-9527), de 43 mm de diámetro, en agua destilada caliente unas horas. Cada matraz con 100 ml, lo dividimos en 4 tubos Falcon con 25 ml de cultivo centrifugamos a 4000 rpm, 4 °C y 10 min.

Ponemos los tubos Falcon en una caja con hielo, para mantenerlos en frío y no se desnaturalicen las proteínas disueltas en el líquido extracelular (sobrenadante). Elaboramos las muestras para dializar con las membranas en forma cilíndrica característica, con cuerdas anudadas en los extremos de las membranas, y verter el LEC del tubo falcon en su interior (**Figura 2.14.a**).

2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

En una bandeja cubierta con PEG colocamos los preparados cilíndricos de diálisis y las cubrimos con Polietilenglicol (PEG 8000), como se aprecia en la **Figura 2.14.a**. Esta bandeja le colocamos una tapadera con papel de aluminio y se dejan en cámara fría (4°C) durante 12 h. Se producirá la salida de líquido por diferencia osmótica, produciéndose la concentración del extracto.

(a)



(b)



Figura 2.14. Proceso de diálisis previa a la liofilización para la obtención de los extractos enzimáticos. (a) Preparación de las muestras para dializar, con las membranas en forma cilíndrica característica. (b) Lavado con tampón fosfato de las muestras para diálisis.

Elaboramos el tampón fosfato potásico 0,05M (pH 7,8), colocamos los preparados cilíndricos de diálisis anudadas con las cuerdas en pipetas y en vaso de precipitado grande (2 l) para su lavado con dicho tampón, a 4°C y 400 rpm, rehidratándose (**Figura 2.14.b**). Realizamos 2 lavados sucesivos de una hora cada uno, cambiándole el tampón. Se pasa el líquido obtenido de la muestra cilíndrica dializada a su correspondiente tubo "falcon", normalmente se obtiene 4-5 ml, se

2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

conserva en congelación (-20 o -80 °C). Continuamos con el proceso de obtención de los extractos finales con una Liofilización durante 48 h.

2.2.3. CEPAS MICROBIANAS SILVESTRES.

La búsqueda, evaluación y selección de cepas microbianas silvestres recogidas en ambientes lipófilos (aceites vegetales y grasas animales), a partir de las cuales se obtienen extractos enzimáticos lipásicos (1,3-selectivos), capaces de realizar reacciones de transesterificación útiles en la síntesis de biocombustible de segunda generación sigue el procedimiento descrito en trabajos anteriores para la recogida de muestras, aislamiento de microorganismos con actividad lipolítica y, de entre estos, aquellos que muestran actividad respecto a la reacción de transesterificación, como se visualiza en la **Figura 2.15** (Escobar-Nino et al., 2014; Mellado, Escobar, Canovas, & Luna, 2013; Sanchez, 2012).

Las reacciones de etanolisis enzimáticas, para la caracterización de las lipasas seleccionadas en los screenings primario y secundario, se realizan mediante la metodología descrita previamente en el **apartado 2.1.2.** y en varias publicaciones, en las que se realiza directamente la alcoholisis enzimática de aceite de girasol (C. Luna et al., 2013; C. Luna, Verdugo, et al., 2014a, 2014b; C. Luna, Verdugo, et al., 2014d; D. Luna et al., 2012; Cristobal Verdugo et al., 2011).

a) CEPAS MICROBIANAS DE ENTORNOS LIPÓFILOS VEGETALES.

Cuatro tipos de muestras fueron recolectadas en diferentes ubicaciones en un molino de aceite en Écija (Sevilla, España) al final de la temporada de cosecha (Enero de 2011). Los tipos de muestras, en función de donde fueron recogidas, son Almazara 1 (AE1B) y Almazara 2 (AE2B), grandes contenedores que contienen los desechos líquidos de la almazara. También se recogieron muestras en la almazara donde se almacenan los residuos sólidos, denominado comúnmente "Alpechín", (AEA) y el último tipo de muestra (AEDH) se obtuvo a partir de los desechos de la cosecha de

2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

aceituna, principalmente contienen restos de olivo, principalmente de oliva (es decir, hojas y ramas deshidratadas) (Escobar-Nino et al., 2014).

Las muestras fueron tomadas y guardadas en tubos de plástico estériles de 50 ml, donde se almacenan en oscuridad a 4 °C hasta que fueron procesadas.

b) CEPAS MICROBIANAS RECOLECTADAS EN GRASA ANIMAL.

Se utilizaron dos tipos de muestras: Muestra del serrín de pescado (HR2-1) y Grasa de jamón utilizada para cubrir la superficie del mismo (HR1-1) y (HR1-2). Ambos tipos de muestras se tomaron en industrias alimentarias localizadas en Fregenal de la Sierra (Badajoz) en 2010. Se tomaron 100 g y 100 ml de serrín de pescado y de la grasa de jamón respectivamente y se recogieron en frascos estériles que se conservaron en frío hasta el momento de su inoculación. Las muestras recogidas se diluyeron en NaOH 0,85% estéril, resuspendiendo 7,28 g de muestra en 25 ml de solución en el caso del serrín de pescado (HR2-1) y 5 ml de muestra en 20 ml de solución para los aceites de jamón (HR1-1) y (HR1-2). En ambos casos se inoculó un volumen final de 100 µl por placa (Sanchez, 2012).

Una vez obtenidas las colonias aisladas, éstas se resembraron en los mismos medios para confirmar, por una parte que se trataban de cultivos puros y, por otra, que poseían actividad lipolítica.

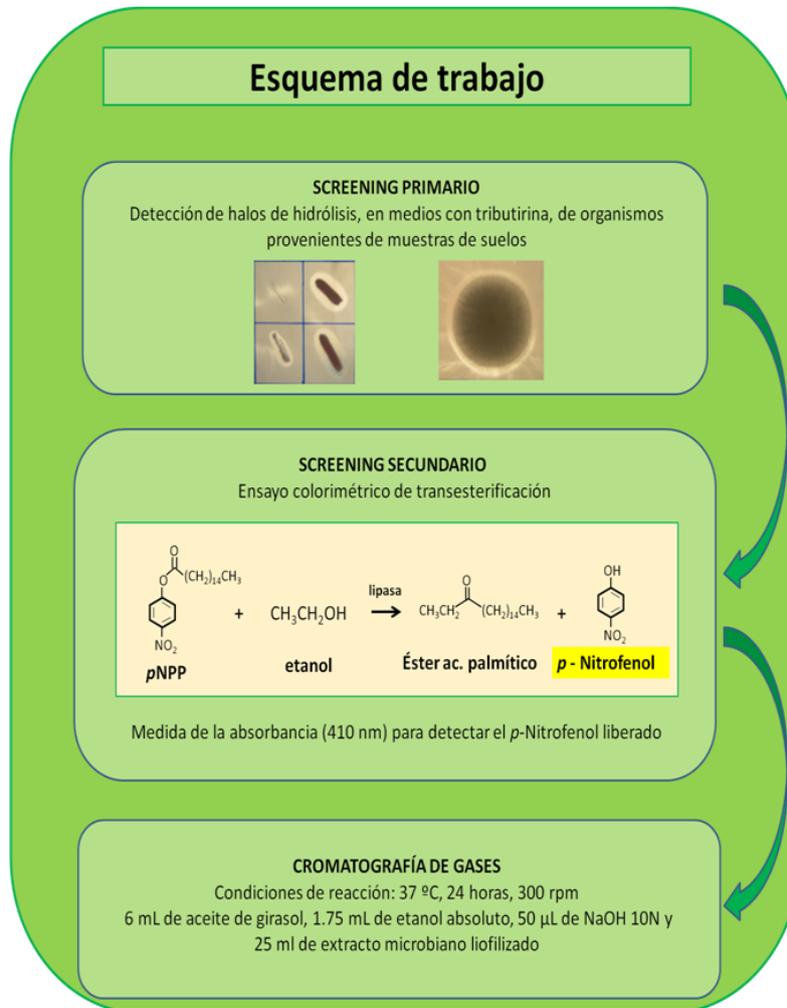


Figura 2.15. Esquema de trabajo: Búsqueda, evaluación y selección de cepas microbianas silvestres recogidas en ambientes lipófilos (ricos en aceites vegetales y grasas animales), a partir de las cuales se obtienen extractos enzimáticos con actividad lipásica (1,3-selectivas).

2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

c) MEDIOS DE CULTIVO.

Los diferentes medios de cultivo utilizados en el presente estudio se prepararon y esterilizaron en autoclave a una temperatura de 121°C durante 20 minutos.

i) Medios de Cultivo No Selectivos.

- **Medio LB (Luria-Bertani):** Bacto-triptona (Difco) al 1%, Extracto de levadura (Difco) al 0,5% y NaCl (Panreac) al 1%.
- **Medio PDA (Potato Dextrose Agar):** 24 g/l PDB (Potato Dextrose Broth) y Agar al 2%.
- **Medio PYA:** Peptona al 1% , Extracto de levadura (Difco) al 0,5%, K₂HPO₄ al 0.1%, MgSO₄.7H₂O al 0,02% y NaCl (Panreac) al 1.5 %.

ii) Medios de cultivo Selectivos para microorganismos lipolíticos.

Todos los microorganismos lipolíticos se cultivaron de forma rutinaria en tres tipos de medios de cultivo: medio Agar-Tri y, medio 9K-G y 9K-Gam.

Para comprobar la actividad lipolítica de las cepas, se utilizan medios suplementados con tributirina. La tributirina, al tratarse de un triacilglicerol, es insoluble en agua, por lo que para la elaboración del medio fue necesario su tratamiento en baño de ultrasonidos durante al menos 10 minutos, con el fin de conseguir una emulsión que homogeneiza el medio. Se utilizó un baño de ultrasonidos (o sonicador) Branson SONIFER 250. Si tras la inoculación e incubación se puede observar áreas claras alrededor de las colonias (lipólisis positiva), se visualiza que el microorganismo es capaz de secretar lipasas.

2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

- **Medio Agar-Tri.** El medio se preparó a partir de los siguientes componentes: Tributirina, 5ml; triptona, 10g; extracto de levadura, 5,0 g; NaCl, 10 g; glucosa, 0,5 %; agar 2 %.

Para la elaboración de los medios 9K-G y 9K-Gam se partió de una solución de sales (K9) y se ajustó el pH a 5,5. La solución K9 (1X) estaba compuesta por los siguientes componentes: $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$, 3 g; KCl, 0,1 g; K_2HPO_4 , 0,5 g; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 0,01 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g. (Silverman & Lundgren, 1959)

- **Medio 9K-G Medium agar.** Compuesto por Solución de sales 9K (1X); Glucosa, 0,5 %; extracto de levadura, 0,5 %; extracto de malta, 1%; agar, 2 %; tributirina, 0,5 %.
- **Medio mínimo 9K- Gam.** Con el fin de aislar hongos y aliviar la carga bacteriana se utilizó este medio. Compuesto por: 9K-G + Ampicilina (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$).
- **LB-Tributirina.** Compuesto por: Medio LB, Agar y tributirina al 0,5 %.
- **PDA-Tributirina.** Compuesto por: Medio PDB, Agar y tributirina al 0,5 %.
- **PYA-Tributirina.** Compuesto por: Medio PYA, Agar y tributirina al 0,5 %.

d) SCREENING PRIMARIO PARA EL AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS QUE MUESTRAN ACTIVIDAD LIPOLÍTICA ("HALO DE HIDRÓLISIS").

Un gramo de muestra de suelo se resuspende en 3 ml de solución salina estéril solución (NaCl 0,85% p/v). Esta suspensión se vuelve a diluir con una solución salina (NaCl 0,85% w/v) para obtener colonias individuales y se siembra en una batería de medios sólidos selectivos con 0,5% tributirina.

Las placas se incuban a 30 ° C durante 4 - 7 días. Los microorganismos que muestran un halo de hidrólisis alrededor de la colonia (**Figura 2.16**), debido a la hidrólisis de la tributirina, son cultivados en placas que contienen medios no

2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

selectivos, LB (bacterias), PDA (hongos) o YPD (levaduras) y a continuación, la actividad lipolítica fue confirmada por el crecimiento de los inóculos, de nuevo en los correspondientes medios que contenían 0,5 % tributirina (selectivos).



Figura 2.16. Cepas formadoras de halo de hidrólisis.

e) SCREENING SECUNDARIO PARA SELECCIONAR MICROORGANISMOS LIPOLÍTICOS QUE MUESTREN TRANSESTERIFICACIÓN.

Para la detección de lipasas con una actividad de transesterificación se desarrolló un método colorimétrico simple, basado en otro recientemente publicado (Teng & Xu, 2007). El método consiste en la transesterificación de para-nitrofenil palmitato (p-NPP) con etanol para liberar el compuesto de color amarillo para-nitrofenol (p-NP), que puede ser posteriormente detectado y cuantificado mediante el uso de un espectrofotómetro. Microorganismos hidrolíticos positivos se cultivan en LB que contiene 0.5% de tributirina durante 3 días a 30 ° C. Después de este tiempo, las células se sedimentan por centrifugación y los sobrenadantes son liofilizados durante 24 horas. El sobrenadante liofilizado se mezcla con 1 ml de p-NPP 10 mM (en n-

2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

hexano) y 60 μ l de etanol absoluto. La mezcla se incuba a 37 ° C con agitación durante 16 horas. Un control negativo se prepara mediante el uso de una mezcla de etanol absoluto y p-NPP. Como control de la actividad hidrolítica de las lipasas se utiliza una mezcla de p-NPP y el sobrenadante liofilizado (sin etanol). Después de 16 horas de reacción, la lipasa se decanta en la parte inferior del tubo durante 10 minutos, a continuación, se toman 25 μ l de sobrenadante y se mezclan con 1 ml de NaOH 0,05 M en una cubeta de 1 ml. El p-NP liberado se extrae de la fase alcalina acuosa, y se cuantifica la absorbancia a 410 nm, utilizando un espectrofotómetro Beckman DU 640.

f) CONCENTRACIÓN DE ENZIMAS EXTRACELULARES.

Para llevar a cabo la inducción en la producción de las lipasas, se cultiva un preinóculo de las cepas seleccionadas en 5 ml de medio LB durante una noche. A las veinticuatro horas, se utiliza dicho cultivo para inocular 25 ml de LB con 0.5 % de tributirina a una $D.O_{600nm}$ final de 0,1. Se deja creciendo durante 3 días, a 30°C y 200 rpm.

El cultivo bacteriano se centrifuga a 4500 rpm durante 5 minutos y el sobrenadante se reserva para la concentración de las proteínas extracelulares. Este sobrenadante se introduce en membranas de diálisis (SIGMA, D-9527) y se cubre con polietilenglicol (PEG) 8000 a 4°C durante la noche para llevar a cabo la concentración de la muestra y precipitación de las proteínas.

La proteínas parcialmente concentradas se someten a diálisis en tampón fosfato potásico 0,05M (pH 7,8), a 4 °C y 400 rpm. Tras cuatro lavados de 30 minutos, el primero, 1 hora el segundo, 1 hora el tercero y el último de 2 horas, se recupera el dializado y se lavan las paredes de la membrana con el tampón de elución, para eliminar la proteína unida. De esta manera se concentran las fracciones activas. El extracto se liofiliza durante 72 horas.

2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

2.3. ANÁLISIS Y OPTIMIZACIÓN DE LOS PRINCIPALES PARÁMETROS DE REACCIÓN.

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

1. Los ensayos **OVAT** ("One Variable At Time") en los que se estudia una variable dentro de un intervalo de trabajo, mientras las demás permanecen constantes. Desafortunadamente, este método no permite determinar, con la máxima certeza, las variables que más influyen en el proceso, dado que se limita a investigar únicamente una parte del intervalo de definición de la variable. Por consiguiente, no se observa la influencia conjunta de las diferentes variables objeto de estudio.
2. El **análisis factorial** es un método de variación múltiple en el cual, todos los parámetros cambian simultáneamente de manera programada. De este modo se desarrolla un estudio eficiente y racional de las variables elegidas en todo su intervalo, que permite obtener una información adicional de los efectos debidos al conjunto de dos o más variables. Este tipo de diseño experimental se está usando ampliamente en la actualidad para analizar la influencia de los parámetros de reacción en todo tipo de reacciones, y concretamente en la producción enzimática de biodiésel (Ferella, Di Celso, De Michelis, Stanisci, & Veglio, 2010; C. Luna, Verdugo, et al., 2014a; C. Luna, Verdugo, et al., 2014d; Tan, Lee, & Mohamed, 2010; Cristobal Verdugo et al., 2011).

En la presente Memoria se ha utilizado esta metodología para analizar el efecto de las variables más influyentes en el proceso de transesterificación enzimática llevado a cabo por varias enzimas, mediante el uso del análisis ANOVA ("Analysis of Variance"). Inicialmente se aplicó la metodología OVAT para la primera enzima estudiada ("Lipopan") (C. Luna, Sancho, et al., 2014), y se pudo comprobar que había variables que podían tener un efecto conjunto y se optó por seguir la metodología de análisis factorial al estudio de la restante enzima comercial (N435) (C. Luna, Verdugo, et al., 2014d).

2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

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

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

2.3.1. LIPOPAN 50 BG

Con esta lipasa comercial de bajo coste se continúan estudios previos ANOVA (Cristobal Verdugo et al., 2011) ampliando el rango de los valores de los parámetros estudiados, así se aplica un estudio OVAT con los parámetros Temperatura, pH y cantidad de enzima (C. Luna, Sancho, et al., 2014). Previamente, se comprueba el efecto de la temperatura por sí sola, en el rendimiento de la reacción sin enzima, a modo de "blanco".

2.3.2. CALB: Lipasa N435

Con respecto a esta lipasa inmovilizada comercial, con el fin de evaluar la influencia de los parámetros cruciales (cantidad de lipasa, temperatura, relación volumétrica aceite/etanol y pH) en la reacción de transesterificación, se aplica un diseño multi-factorial de experimentos con metodología de superficie de respuesta (RSM) (C. Luna, Sancho, et al., 2014). Dicho diseño multifactorial de experimentos, que cuenta con tres factores, se obtiene aplicando la versión de software Stat Graphics "Centurion XVI.I".

Este estudio ha sido desarrollado para optimizar el comportamiento catalítico de esta lipasa 1,3-selectiva (N435) en la etanolisis parcial de aceite de girasol, para obtener un biocombustible que integra glicerol como MG, junto a las diferentes FAEEs en dicho proceso de etanolisis enzimática, así como con el exceso de etanol sin reaccionar. Esta mezcla de biocombustibles actualmente llamado Ecodiésel es capaz de operar directamente en los motores diésel, sólo o en cualquier mezcla con combustible diésel fósil, sin más separación o proceso de purificación, eliminando el alcohol no reaccionado.

a) Análisis de la varianza (ANOVA) y la optimización de los parámetros de reacción por Metodología Superficie-Respuesta (RSM).

El método de análisis de la varianza (ANOVA) se muestra muy atractivo y útil en la optimización de los parámetros de reacción y en la evaluación de los efectos de los parámetros en la reacción de transesterificación de triglicéridos (Chang et al., 2009; C. Luna, Verdugo, et al., 2014c; Tan et al., 2010; Cristobal Verdugo et al., 2011) debido a su eficacia en el análisis de variables.

El efecto de los principales parámetros de reacción en el proceso de transesterificación enzimática para obtener las condiciones óptimas para maximizar resultados en la viscosidad, la selectividad y la conversión se estudian utilizando un diseño multifactorial de los experimentos con tres factores aplicando el software Stat Graphics "Centurion XVI.I". Dos de ellos se desarrollan en tres niveles, y el último a dos niveles, por lo que se obtienen 36 reacciones, cada una con diferentes condiciones experimentales. Los experimentos se realizan en orden aleatorio. Los parámetros

2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

experimentales seleccionados para este estudio son la temperatura de reacción, la relación aceite de girasol / etanol (v / v) y diferentes valores de pH obtenidos por la adición de mínimos volúmenes variables, de una disolución de NaOH 10N. La **Tabla 3.9** muestra los valores codificados y reales de los parámetros del proceso, utilizados en la matriz de diseño.

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

Variables	Unidad	Niveles		
		-1	0	1
Temperatura	°C	20	30	40
Ratio Aceite/Etanol (v/v)	mL/mL	12/1,75	-	12/3.5
pH	μL (NaOH 10N)	8 (12.5)	10 (5)	12 (50)

Los datos experimentales obtenidos a través del diseño experimental se analizan mediante la metodología de superficie de respuesta (RSM) (Chang et al., 2009; C. Luna, Verdugo, et al., 2014c; Tan et al., 2010; Cristobal Verdugo et al., 2011). Se ha desarrollado un modelo matemático, que sigue una ecuación polinómica de segundo grado, para describir las relaciones entre la variable de respuesta predicha (Viscosidad, Conversión y Selectividad) y las variables independientes de las condiciones de reacción, como se muestra en la **Ecuación (2.5)**. Donde Y es la variable de respuesta predicha; β_0 , β_i , β_{ii} , β_{ij} los coeficientes constantes de intercepción, lineal, cuadráticos y de interacción del modelo. Respectivamente, X_i , X_j ($i = 1, 3$; $j = 1, 3$; $i \neq j$) representan las variables independientes codificadas. (C. Luna, Verdugo, et al., 2014d).

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i x_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j=1}^3 \sum_{j=1}^3 \beta_{ij} x_i x_j \quad (2.5)$$

2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Los gráficos de superficie de respuesta fueron desarrollados usando la ecuación polinómica cuadrática ajustada, obtenida a partir del análisis de regresión, manteniendo una de las variables independientes en valores constantes, correspondientes al punto estacionario y cambiando las otras dos variables. La calidad del ajuste de la ecuación de modelo polinomial se evaluó mediante el coeficiente de determinación R^2 , y la significancia de este coeficiente de regresión se comprueba con el test F. Experimentos de confirmación se llevaron a cabo con el fin de validar el modelo, usando combinaciones de variables independientes que no eran parte del diseño experimental original, pero dentro de la región experimental.

b) Efecto de la cantidad de lipasa.

El efecto de la cantidad de lipasa en el medio de reacción es muy importante para seleccionar las condiciones de reacción correcta u óptima. Este parámetro se evaluó mediante metodología OVAT con el fin de elegir la cantidad necesaria de lipasa que maximiza el rendimiento sin las limitaciones de transferencia de masa. Se aplicaron las condiciones de reacción optimizadas previamente mediante la RSM (12 ml de aceite / 3.5 ml de EtOH, 30 °C, 12,5 µl de NaOH 10 N, agitación superior a 300 rpm, durante 2 h) (C. Luna, Verdugo, et al., 2014d).

2.4. REFERENCIAS

- Blanco, R. M., Terreros, P., Fernandez-Perez, M., Otero, C., & Diaz-Gonzalez, G. (2004). Functionalization of mesoporous silica for lipase immobilization - Characterization of the support and the catalysts. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 30(2), 83-93. doi: 10.1016/j.molcatb.2004.03.012
- Blanco, R. M., Terreros, P., Munoz, N., & Serra, E. (2007). Ethanol improves lipase immobilization on a hydrophobic support. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 47(1-2), 13-20. doi: 10.1016/j.molcatb.2007.03.003
- Calero, J., Luna, D., Sancho, E. D., Luna, C., Bautista, F. M., Romero, A. A., . . . Verdugo-Escamilla, C. (2015). An overview on glycerol-free processes for the production of renewable liquid biofuels, applicable in diesel engines. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, 42, 1437-1452. doi: 10.1016/j.rser.2014.11.007
- Chang, C., Chen, J. H., Chang, C. M. J., Wu, T. T., & Shieh, C. J. (2009). Optimization of lipase-catalyzed biodiesel by isopropanolysis in a continuous packed-bed reactor using response surface methodology. *New Biotechnology*, 26(3-4), 187-192. doi: 10.1016/j.nbt.2009.07.010
- Dzida, M., & Prusakiewicz, P. (2008). The effect of temperature and pressure on the physicochemical properties of petroleum diesel oil and biodiesel fuel. *Fuel*, 87(10-11), 1941-1948. doi: 10.1016/j.fuel.2007.10.010
- Escobar-Nino, A., Luna, C., Luna, D., Marcos, A. T., Canovas, D., & Mellado, E. (2014). Selection and Characterization of Biofuel-Producing Environmental Bacteria Isolated from Vegetable Oil-Rich Wastes. *Plos One*, 9(8). doi: 10.1371/journal.pone.0104063
- Feng, X., Fryxell, G. E., Wang, L. Q., Kim, A. Y., Liu, J., & Kemner, K. M. (1997). Functionalized monolayers on ordered mesoporous supports. *Science*, 276(5314), 923-926. doi: 10.1126/science.276.5314.923
- Ferella, F., Di Celso, G. M., De Michelis, I., Stanisci, V., & Veglio, F. (2010). Optimization of the transesterification reaction in biodiesel production. *Fuel*, 89(1), 36-42. doi: 10.1016/j.fuel.2009.01.025
- Gascon, V. (2014). *Avances en las propiedades de biocatalizadores: Diseño y obtención de materiales mesoporosos ordenados como soportes para la inmovilización no covalente de enzimas*. (Tesis Doctoral), Instituto de Catálisis y Petroleoquímica, CSIC, Madrid. (<http://hdl.handle.net/10261/112074>)
- Goto, S., Sugiyama, J., & Iizuka, H. (1969). A TAXONOMIC STUDY OF ANTARCTIC YEASTS. *Mycologia*, 61(4), 748-&. doi: 10.2307/3757466

2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

- Guo, W. P., Park, J. Y., Oh, M. O., Jeong, H. W., Cho, W. J., Kim, I., & Ha, C. S. (2003). Triblock copolymer synthesis of highly ordered large-pore periodic mesoporous organosilicas with the aid of inorganic salts. *Chemistry of Materials*, *15*(12), 2295-+. doi: 10.1021/cm0258023
- Hoffmann, F., Cornelius, M., Morell, J., & Froeba, M. (2006). Silica-based mesoporous organic-inorganic hybrid materials. *Angewandte Chemie-International Edition*, *45*(20), 3216-3251. doi: 10.1002/anie.200503075
- Kim, H. S., Jeon, J. W., Lee, H. W., Park, Y. I., Seo, W. T., Oh, H. M., . . . Yoon, B. D. (2002). Extracellular production of a glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipid, from *Candida antarctica*. *Biotechnology Letters*, *24*(3), 225-229. doi: 10.1023/a:1014100422857
- Lee, K. H., Park, C.-H., & Lee, E. Y. (2010). Biosynthesis of glycerol carbonate from glycerol by lipase in dimethyl carbonate as the solvent. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, *33*(9), 1059-1065. doi: 10.1007/s00449-010-0431-9
- Luna, C., Sancho, E., Luna, D., Caballero, V., Calero, J., Posadillo, A., . . . Romero, A. A. (2013). Biofuel that Keeps Glycerol as Monoglyceride by 1,3-Selective Ethanolysis with Pig Pancreatic Lipase Covalently Immobilized on AlPO₄ Support. *Energies*, *6*(8), 3879-3900. doi: 10.3390/en6083879
- Luna, C., Sancho, E. D., Luna, D., Calero, J., Verdugo, C., Posadillo, A., . . . Romero, A. A. (2014). PRODUCTION OF A BIOFUEL SIMILAR TO CONVENTIONAL BIODIESEL THAT AVOIDS RESIDUAL GLYCEROL BY USING LIPOPAN 50BG, A LOW COST COMMERCIAL *THERMOMYCES LANUGINOSUS* LIPASE. *Récents Progrès en Génie des Procédés*, *106*(GPE – 4th International Congress on Green Process Engineering 7-10 April 2014 – Sevilla (Spain)).
- Luna, C., Verdugo, C., Sancho, E. D., Luna, D., Calero, J., Posadillo, A., . . . Romero, A. A. (2014a). A Biofuel Similar to Biodiesel Obtained by Using a Lipase from *Rhizopus oryzae*, Optimized by Response Surface Methodology. *Energies*, *7*(5), 3383-3399. doi: 10.3390/en7053383
- Luna, C., Verdugo, C., Sancho, E. D., Luna, D., Calero, J., Posadillo, A., . . . Romero, A. A. (2014b). Biocatalytic Behaviour of Immobilized *Rhizopus oryzae* Lipase in the 1,3-Selective Ethanolysis of Sunflower Oil to Obtain a Biofuel Similar to Biodiesel. *Molecules*, *19*(8), 11419-11439. doi: 10.3390/molecules190811419
- Luna, C., Verdugo, C., Sancho, E. D., Luna, D., Calero, J., Posadillo, A., . . . Romero, A. A. (2014c, 14-31 March 2014). *Biofuel Similar to Biodiesel Obtained by Using a Lipase from Rhizopus Oryzae, Optimized by Response Surface Methodology*. Paper presented at the 1st Int. e-Conf. on Energ, Sciforum Electronic Conference Series.
- Luna, C., Verdugo, C., Sancho, E. D., Luna, D., Calero, J., Posadillo, A., . . . Romero, A. A. (2014d). Production of a biodiesel-like biofuel without glycerol generation, by using Novozym 435, an immobilized *Candida antarctica* lipase. *Bioresources and Bioprocessing*, *1*(11). doi: doi:10.1186/s40643-014-0011-y

2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

- Luna, D., Posadillo, A., Caballero, V., Verdugo, C., Bautista, F. M., Romero, A. A., . . . Calero, J. (2012). New Biofuel Integrating Glycerol into Its Composition Through the Use of Covalent Immobilized Pig Pancreatic Lipase. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(8), 10091-10112. doi: 10.3390/ijms130810091
- Mellado, E., Escobar, A., Canovas, D., & Luna, D. (2013). *Spanish Patent*, Patent No.: U. o. S. University of Cordoba.
- Min, J. Y., & Lee, E. Y. (2011). Lipase-catalyzed simultaneous biosynthesis of biodiesel and glycerol carbonate from corn oil in dimethyl carbonate. *Biotechnology Letters*, 33(9), 1789-1796. doi: 10.1007/s10529-011-0627-3
- Moayedallaie, S., Mirzaei, M., & Paterson, J. (2010). Bread improvers: Comparison of a range of lipases with a traditional emulsifier. *Food Chemistry*, 122(3), 495-499. doi: 10.1016/j.foodchem.2009.10.033
- Muth, O., Schellbach, C., & Froba, M. (2001). Triblock copolymer assisted synthesis of periodic mesoporous organosilicas (PMOs) with large pores. *Chemical Communications*(19), 2032-2033. doi: 10.1039/b106636f
- Na, W., Wei, Q., Lan, J.-N., Nie, Z.-R., Sun, H., & Li, Q.-Y. (2010). Effective immobilization of enzyme in glycidoxypropyl-functionalized periodic mesoporous organosilicas (PMOs). *Microporous and Mesoporous Materials*, 134(1-3), 72-78. doi: 10.1016/j.micromeso.2010.05.009
- Predojevic, Z. J. (2008). The production of biodiesel from waste frying oils: A comparison of different purification steps. *Fuel*, 87(17-18), 3522-3528. doi: 10.1016/j.fuel.2008.07.003
- Qiao, S. Z., Yu, C. Z., Hu, Q. H., Jin, Y. G., Zhou, X. F., Zhao, X. S., & Lu, G. Q. (2006). Control of ordered structure and morphology of large-pore periodic mesoporous organosilicas by inorganic salt. *Microporous and Mesoporous Materials*, 91(1-3), 59-69. doi: 10.1016/j.micromeso.2005.11.017
- Ren, T., Zhang, X. M., & Suo, J. S. (2002). Synthesis of periodic mesoporous organosilicas via the "S+X-I+" route. *Microporous and Mesoporous Materials*, 54(1-2), 139-144. doi: 10.1016/s1387-1811(02)00360-8
- Rocabruno-Valdes, C. I., Ramirez-Verduzco, L. F., & Hernandez, J. A. (2015). Artificial neural network models to predict density, dynamic viscosity, and cetane number of biodiesel. *Fuel*, 147, 9-17. doi: 10.1016/j.fuel.2015.01.024
- Rodriguez-Contreras, A., Calafell-Monfort, M., & Soledad Marques-Calvo, M. (2012). Enzymatic degradation of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) by commercial lipases. *Polymer Degradation and Stability*, 97(4), 597-604. doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2012.01.007
- Salis, A., Svensson, I., Monduzzi, M., Solinas, V., & Adlercreutz, P. (2003). The atypical lipase B from *Candida antarctica* is better adapted for organic media than the typical lipase from *Thermomyces lanuginosa*. *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*, 1646(1-2), 145-151. doi: 10.1016/s1570-9639(02)00556-3

2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

- Sanchez, L. (2012). *Desarrollo de sistemas biológicos para la obtención de energías renovables (biodiesel). Lipasas microbianas*. (Trabajo Fin de Master), Universidad de Sevilla (US), Sevilla.
- Serra, E., Mayoral, A., Sakamoto, Y., Blanco, R. M., & Diaz, I. (2008). Immobilization of lipase in ordered mesoporous materials: Effect of textural and structural parameters. *Microporous and Mesoporous Materials*, 114(1-3), 201-213. doi: 10.1016/j.micromeso.2008.01.005
- Silverman, M. P., & Lundgren, D. G. (1959). STUDIES ON THE CHEMOAUTOTROPHIC IRON BACTERIUM FERROBACILLUS-FERROOXIDANS .1. AN IMPROVED MEDIUM AND A HARVESTING PROCEDURE FOR SECURING HIGH CELL YIELDS. *Journal of Bacteriology*, 77(5), 642-647.
- Sinkuniene, D., Bendikiene, V., & Juodka, B. (2011). Response surface methodology-based optimization of lipase-catalyzed triolein hydrolysis in hexane. *Romanian Biotechnological Letters*, 16(1), 5891-5901.
- Stojceska, V., & Ainsworth, P. (2008). The effect of different enzymes on the quality of high-fibre enriched brewer's spent grain breads. *Food Chemistry*, 110(4), 865-872. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.02.074
- Tan, K. T., Lee, K. T., & Mohamed, A. R. (2010). A glycerol-free process to produce biodiesel by supercritical methyl acetate technology: an optimization study via Response Surface Methodology. *Bioresource technology*, 101(3), 965-969. doi: 10.1016/j.biortech.2009.09.004
- Teng, Y., & Xu, Y. (2007). A modified para-nitrophenyl palmitate assay for lipase synthetic activity determination in organic solvent. *Analytical Biochemistry*, 363(2), 297-299. doi: 10.1016/j.ab.2007.01.026
- Verdugo, C., Luna, D., Posadillo, A., Sancho, E. D., Rodriguez, S., Bautista, F., . . . Romero, A. A. (2011). Production of a new second generation biodiesel with a low cost lipase derived from *Thermomyces lanuginosus*: Optimization by response surface methodology. *Catalysis Today*, 167(1), 107-112. doi: 10.1016/j.cattod.2010.12.028
- Verdugo, C., Luque, R., Luna, D., Hidalgo, J. M., Posadillo, A., Sancho, E. D., . . . Romero, A. A. (2010). A comprehensive study of reaction parameters in the enzymatic production of novel biofuels integrating glycerol into their composition. *Bioresource Technology*, 101(17), 6657-6662. doi: 10.1016/j.biortech.2010.03.089
- Wan, Y., & Zhao, D. (2007). On the controllable soft-templating approach to mesoporous silicates. *Chemical Reviews*, 107(7), 2821-2860. doi: 10.1021/cr068020s
- Xu, Y., Nordblad, M., & Woodley, J. M. (2012). A two-stage enzymatic ethanol-based biodiesel production in a packed bed reactor. *Journal of Biotechnology*, 162(4), 407-414. doi: 10.1016/j.jbiotec.2012.05.017

2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

- Yara-Varon, E., Joli, J. E., Torres, M., Sala, N., Villorbina, G., Mendez, J. J., & Canela-Garayoa, R. (2012). Solvent-free biocatalytic transesterification of acrylate derivatives. *Catalysis Today*, *196*(1), 86-90. doi: 10.1016/j.cattod.2012.02.055
- Zhai, S.-R., Kim, I., & Ha, C.-S. (2008). Synthesis and characterization of periodic mesoporous organosilicas from bridged organosilanes in the presence of mixed salts. *Journal of Solid State Chemistry*, *181*(1), 67-74. doi: 10.1016/j.jssc.2007.11.011



Ramón Lapayese del Río (1956)

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

En este capítulo se exponen, de forma ordenada, los resultados de los trabajos experimentales llevados a cabo para obtener información relevante que permita alcanzar el objetivo general, es decir desarrollar, optimizar y hacer más viable la producción enzimática de Ecodiésel. Para la consecución de estos objetivos se ha seguido la metodología experimental prevista en el Plan de Trabajo. Así, se han evaluado los diferentes sistemas lipásicos propuestos, también se ha estudiado la influencia de las diferentes variables más influyentes, como sus valores óptimos (temperatura, pH, Ratio Aceite/Etanol, cantidad de lipasa, etc.) que afectan la reacción de transesterificación selectiva enzimática, atendiendo a varios parámetros de interés, como pueden ser: la Conversión y Selectividad (contenido en FAEE y MG), así como la Viscosidad cinemática, siendo este último un parámetro clave para la medida de la utilidad de estos biocombustibles para su uso en motores diésel.

3.1. LIPOPAN.

3.1.1. Optimización de las condiciones de reacción de la etanolisis enzimática para la obtención de Ecodiésel.

Las condiciones de operación óptimas del proceso de etanolisis para los diferentes sistemas biocatalíticos (CALB inmovilizada no covalente, extractos enzimáticos de cepas de CALB o extractos enzimáticos de cepas autóctonas recogidas en ambientes lipófilos) se determinan realizando un estudio (temperatura, pH, cantidades relativas de lipasa, aceite/etanol) empleando una lipasa comercial de referencia *LIPOPAN 50 BG* (Novozime®) (extraída de *Thermomyces lanuginosus* e insertada en *Aspergillus oryzae*), previamente estudiada en este proceso (Cristobal

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Verdugo et al., 2011), y aplicada habitualmente en la industria de la panadería como emulgente. Estos resultados nos sirven de referencia para el estudio de esta misma reacción empleando otros sistemas biocatalíticos, como CALB inmovilizada en forma no covalente, u obtenida a partir de extractos enzimáticos de menor pureza (liofilizados con diálisis previa) de cepas CALB estándar adquirida en la CECT (Colección Española de Cultivos Tipo) o de microorganismos silvestres muestreados, cuyas características serán previsiblemente más variables, diferentes y/o cambiantes.

Para estudiar la influencia de la temperatura en dicha reacción, también se lleva a cabo ésta en ausencia lipasa alguna (reacción del blanco) para poder valorar correctamente los resultados y poder determinar el efecto de la temperatura por sí sola en el rendimiento de la reacción. Así, como se aprecia en la **Tabla 3.1**, a medida que aumenta la temperatura, la reacción es ligeramente más efectiva, con mayor selectividad, reduciéndose asimismo la viscosidad. No obstante, en experiencias sucesivas, las reacciones se llevaran a cabo a la temperatura más baja estudiada, a 30 °C, ya que aunque se den con un poco menor rendimiento que a temperaturas superiores, se podrá estimar mejor la eficacia catalítica de la lipasa, sin la mayor interferencia que se produce a temperaturas más elevadas, en las que aumenta la contribución de la reacción no catalizada.

Tabla 3.1. Influencia de la temperatura en las reacciones efectuadas en ausencia de lipasas (reacciones “blanco”), operando en condiciones estándar: 6 ml aceite de girasol, 1.75 ml de etanol absoluto y 0.0125 ml de NaOH 10 N, operando durante 24 horas.

Temperatura	Viscosidad (cSt)	Conversión (%)	Selectividad (%)
39 °C	10.8	56.3	48.7
35 °C	11.5	50.2	43.6
30 °C	11.8	45.1	40.2

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Podemos observar en las experiencias recogidas en la **Tabla 3.2** que la presencia en cantidades mínimas de NaOH es fundamental para obtener la reacción de transesterificación enzimática selectiva, su cantidad influye de forma importante en el rendimiento de la reacción. La reacción realizada con la lipasa sin sosa alguna aunque viable, no alcanza valores comparables a los obtenidos con 0,0125 ml de NaOH 10N. De esta manera, una cantidad de 0.0125-0,025 ml de NaOH, para 5 mmol de aceite de girasol es una relación óptima para obtener el mejor rendimiento enzimático. Blancos realizados sin lipasa, y con las concentraciones óptimas de NaOH, dan valores mínimos de actividad, similares a los de la lipasa sin NaOH, Se obtuvo la conversión de menos de aproximadamente del 10% del material de partida, de modo que una contribución catálisis básica homogénea se puede excluir en las condiciones de reacción actuales. Es decir, la acción biocatalítica de la lipasa Lipopan 50 BG se debe a la acción conjunta de mínimas cantidades de lipasa y NaOH muy concentrada (Caballero et al., 2009; C. Luna et al., 2013; D. Luna et al., 2012).

En estos estudios previos también se confirmó que sustituir la disolución de NaOH por otra disolución salina (disolución acuosa 2N de KH_2PO_4) que aportara fuerza iónica al entorno, tampoco confiere viabilidad al proceso.

Viendo los resultados de las diferentes reacciones realizadas en las condiciones estándar indicadas en la **Tabla 3.2**, pero variando la cantidad de lipasa empleada. Se puede comprobar que la cantidad de lipasa influye positivamente en la reacción, alcanzando un máximo con 0.01 g de lipasa, como valor óptimo. Estos resultados coinciden básicamente con otros ya descritos, en los que sólo son necesarias cantidades mínimas para alcanzar el máximo rendimiento (Cristobal Verdugo et al., 2011).

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tabla 3.2. Viscosidad, Conversión, Selectividad, velocidades de conversión, como Turn Over Frequency (TOF), expresadas en $\text{mmol min}^{-1} \text{g cat}^{-1}$, y Actividad de la enzima (U / mg de lipasa). Obtenidas en la reacción de transesterificación de diferentes cantidades de aceite de girasol y de etanol absoluto, operando con diferentes cantidades de lipasa Lipopan 50BG a lo largo de 2 h, a 30 °C de temperatura de reacción y bajo condiciones ligeramente alcalinas, obtenidas por la adición de diferentes cantidades de disolución acuosa de NaOH 10N.

Lipase (g)	NaOH (μl)	Temp ($^{\circ}\text{C}$)	EtOH/Oil (ml);(molar ratio)	Visc (cSt)	Sel (%)	Conv (%)	TOF	Activity (U/mg)
0.01	0	30	1.75/6; (6:1)	16.8	8.5	9.3	0.15	6.67
0.007	12.5	30	1.75/6; (6:1)	9.4	77.9	85.7	20.48	0.049
0.01	12.5	30	1.75/6; (6:1)	10.1	96.1	100	16.66	0.06
0.02	12.5	30	1.75/6;(6:1)	9.8	97.9	100	8.33	0.12
0.03	12.5	30	1.75/6; (6:1)	11.5	90.2	100	5.55	0.18
0.04	12.5	30	1.75/6; (6:1)	10.7	98.0	100	4.17	0.24
0.01	25	30	3.5/12; (6:1)	11.1	92.1	100	16.66	0.06
0.01	37.5	25	3.5/12; (6:1)	9.6	97.9	100	16.66	0.06
0.01	50	30	3.5/12; (6:1)	10.3	98.0	100	16.66	0.06

El efecto de la cantidad de lipasa se evalúa con el fin de utilizar sólo la cantidad necesaria de lipasa para maximizar el rendimiento, sin limitaciones de transferencia de masa. El uso de grandes cantidades de lipasa puede tener un efecto perjudicial sobre la economía del proceso, ya que los rendimientos de reacción o los valores de viscosidad no podrían mejorar mediante el uso de más cantidad de biocatalizador.

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

De acuerdo con estos resultados (**Tabla 3.2**), las condiciones óptimas para la realización de las reacciones de etanolisis, se consiguen empleando las cantidades mínimas eficaces de disolución de sosa y lipasa, 0.01 ml de NaOH 10 N y 0.01 g, respectivamente, con los volúmenes de reactivos indicados: 6 ml aceite de girasol comercial, 1.75 ml de Etanol absoluto, operando a 30 °C durante 2horas.

3.2. CALB. (Lipasa tipo B de *Candida antarctica*).

En lo que respecta a la lipasa tipo B proveniente de la levadura *Candida antarctica* (CALB), aplicada en las diferentes formas estudiadas: inmovilizada comercial, libre purificada comercial, así como lipasa comercial inmovilizada en laboratorio, o en extractos enzimáticos lipásicos, obtenidos a partir de cultivos líquidos de cepas estándares de la misma, provenientes de la CECT (Colección Española de Cultivos Tipo), hay que indicar que en todos los casos se obtienen buenos resultados, como puede confirmarse en los datos consignados en los siguientes apartados.

3.2.1. NOVOZYM 435 (N435)

Con respecto a esta lipasa inmovilizada comercial, ya descrita en la obtención de biodiésel (Rivera, Villanueva, & Sandoval, 2009), como se indicó anteriormente, con el fin de evaluar la influencia de los parámetros cruciales (cantidad de lipasa, temperatura, relación volumétrica aceite/etanol y pH) en la reacción de transesterificación selectiva se aplica un diseño multi-factorial de experimentos con metodología de superficie de respuesta (RSM) (C. Luna, Sancho, et al., 2014; C. Luna, Verdugo, et al., 2014a; Cristobal Verdugo et al., 2011). Dicho diseño multifactorial de experimentos, que cuenta con tres factores, se obtiene aplicando la versión de software Stat Graphics "Centurion XVI.I".

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

a) ANÁLISIS DE LA VARIANZA (ANOVA) Y LA OPTIMIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE REACCIÓN POR RSM.

I. Diseño Experimental.

Como ya se ha indicado anteriormente en el **apartado 2.3.2**, se ha realizado un diseño experimental factorial multinivel con la finalidad de analizar la influencia de la temperatura, el pH y la relación aceite/alcohol, así como la magnitud de esta influencia. Para ello se han fijado unos límites a cada variable y se ha estudiado el efecto de las variables en la conversión, la Selectividad (cantidad de FAEE y MG obtenidos) y la viscosidad cinemática de la mezcla final.

Los intervalos de estudio, para pH van desde 8 á 12, la temperatura entre 20 - 60 °C y relaciones volumétricas aceite/etanol entre 12/1.75 y 12/3.5, lo que equivale a relaciones molares en el intervalo 1/3 - 1/6, aproximadamente. El peso de enzima es de 0.5 g en todas las reacciones del diseño experimental.

En la **Tabla 3.3** se muestran los parámetros analizados en el diseño experimental, así como los valores usados como códigos en las matrices del análisis y sus correspondientes valores reales. Cada experimento se ha realizado por duplicado para asegurar la reproducibilidad de cada reacción y mejorar así el modelo.

El diseño llevado a cabo consta de 18 experimentos (*runs*) que son realizadas por duplicado y en forma aleatoria para minimizar posibles errores. La secuencia de experimentos a realizar se muestra en la **Tabla 3.4**.

Una vez realizados los 36 experimentos correspondientes al diseño propuesto y obtenidos los resultados de los análisis de la composición del biocombustible obtenido y su viscosidad cinemática, para cada reacción efectuada, se completó el mismo diseño con los datos experimentales (variables respuesta) y se realizó el análisis de los datos

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

con el software Statgraphics®, el cual se vale de la aplicación de un método de análisis multivariable (ANOVA) para establecer las relaciones entre las variables en estudio.

Tabla 3.3. Parámetros analizados en el diseño factorial: códigos utilizados y valores reales.

Variables	Unidad	Niveles		
		-1	0	1
Temperatura	°C	20	30	40
Ratio Aceite/Etanol (v/v)	mL/mL	12/1,75	-	12/3.5
pH ¹	μL (NaOH 10N)	8 (12.5)	10 (25)	12 (50)

¹ Valor del pH obtenido mediante papel indicador.

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

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tabla 3.4. Matriz de experimentos del diseño factorial y las respuestas obtenidas para la Conversión, Selectividad y Viscosidad cinemática para la primera y segunda series.

Parámetros						
Run	Temperatura	Ratio Aceite/Etanol	pH	Conversión (%)	Selectividad (%)	Viscosidad Cinemática (mm ² s ⁻¹)
1	1	-1	0	81.4	45.99	20.3
2	1	-1	-1	84.6	46.1	21.3
3	0	-1	-1	78.6	29.2	21.0
4	-1	-1	0	59.1	11.7	20.8
5	-1	1	1	100	40.4	13.3
6	1	1	1	100	39.6	22.3
7	-1	-1	-1	63.6	23.3	22.1
8	0	-1	1	89.5	34.1	19.0
9	0	1	0	95.7	31.4	15.2
10	0	-1	0	100	44.2	20.1
11	0	1	1	95.2	37.5	15.7
12	1	-1	1	100	72.5	18.6
13	1	1	-1	100	46.6	18.2
14	1	1	0	86.1	36.1	19.8
15	-1	1	0	94.9	46.8	13.4
16	-1	1	-1	100	70.9	10.8
17	0	1	-1	100	52.6	12.5
18	-1	-1	1	77.5	17.8	20.2
Repetición de experimentos				Conversión (%)	Selectividad (%)	Viscosidad Cinemática (mm ² s ⁻¹)
Run	Temperatura	Ratio Aceite/Etanol	pH			
19	0	-1	0	100	43.4	22.5
20	-1	1	1	100	39.7	13.2
21	-1	-1	-1	64.4	22.6	20.1
22	-1	1	0	95.8	46.1	13.4
23	1	1	-1	100	47.5	16.2
24	0	1	-1	100	51.9	14.5
25	-1	1	-1	100	69.6	10.9
26	0	1	0	96.5	36.5	14.6
27	1	1	1	100	38.8	22.2
28	0	-1	-1	80.1	28.6	19.0
29	1	-1	1	100	71.4	18.5
30	-1	-1	0	60.2	11.0	20.3
31	1	-1	0	82.2	45.2	20.3
32	1	1	0	86.9	33.4	19.5
33	0	-1	1	90.3	33.4	18.1
34	0	1	1	97.0	36.8	15.1
35	1	-1	-1	85.4	43.4	21.6
36	-1	-1	1	69.7	16.3	20.6

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

II. Análisis de los datos.

A partir de los datos mostrados en la **Tabla 3.4** y mediante el software Statgraphics, se ha realizado un análisis estadístico multivariable (ANOVA) para determinar la correlación o "efectos" de las variables experimentales estudiadas con las variables de salida estudiadas (Conversión, Selectividad y Viscosidad cinemática). El software nos brinda diferentes salidas de datos que nos permiten analizar la influencia de las variables independientes en la variable dependiente en estudio.

▪ **RESULTADOS PARA CONVERSIÓN.**

Los datos experimentales obtenidos para la variable de salida conversión se muestran en la **Tabla 3.4**.

En la **Tabla 3.5** se muestran los datos obtenidos del análisis inicial de los datos, teniendo en cuenta a todas las variables experimentales estudiadas así como sus interacciones de segundo orden, o sea, interacciones de unas con otras en pares.

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

En la siguiente **Tabla 3.6**, se muestran los resultados del análisis de varianza (ANOVA) llevado a cabo con los datos experimentales obtenidos para el modelo anteriormente diseñado. Se destacan en cursiva los datos con un valor $P < 0.05$, los cuales indican que esa interacción entre variables tiene un efecto significativo sobre la conversión. En este caso, se ha demostrado que las variables que tienen un efecto

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

significativo sobre la conversión con la relación aceite/etanol y el pH, tanto en una relación simple como de forma cuadrática.

Tabla 3.5. Efectos estimados para la variable Conversión.

Efecto	Estimado	Error Estándar	V.I.F.
Promedio	90,8444	2,38494	
A: Temperatura	10,1167	2,61257	1,0
B: Aceite/Etanol ratio	15,6389	2,13316	1,0
C: pH	5,20833	2,61257	1,0
AA	-12,8333	4,52511	1,0
AB	-13,0667	2,61257	1,0
AC	1,35	3,19974	1,0
BC	-6,50833	2,61257	1,0
CC	8,19167	4,52511	1,0
Bloque	0,127778	2,13316	1,0

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

También se muestran al pie de la **Tabla 3.6** los coeficientes de correlación R^2 y R^2 ajustado, que permiten conocer el grado de ajuste de los datos al modelo propuesto, teniendo en este caso valores aceptables (Chen, Du, & Liu, 2008; Ghadge & Raheman, 2006; Li, Du, & Liu, 2007; Yucel, 2012) tratándose de un sistema enzimático complejo y afectable por muchas variables. El R^2 ajustado nos permite comparar el modelo con otros distintos, independientemente de que el número de variables estudiadas en uno y otro sea diferente, ya que es un coeficiente ajustado al número de grados de libertad del modelo estudiado.

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tabla 3.6. Análisis de Varianza (ANOVA) para la variable Conversión.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Temperatura	614,082	1	614,082	14,99	<i>0,0007</i>
B: Aceite/Etanol ratio	2201,17	1	2201,17	53,75	<i>0,0000</i>
C: pH	162,76	1	162,76	3,97	0,0568
AA	329,389	1	329,389	8,04	<i>0,0087</i>
AB	1024,43	1	1024,43	25,01	<i>0,0000</i>
AC	7,29	1	7,29	0,18	0,6766
BC	254,15	1	254,15	6,21	<i>0,0194</i>
CC	134,207	1	134,207	3,28	0,0818
Bloques	0,146944	1	0,146944	0,00	0,9527
Error total	1064,78	26	40,9532		
Total (correlación)	5792,41	35			

$R^2 = 81,6176 \%$

R^2 (ajustada por g.l.) = 76,171 %

Error estándar del estimado = 6,39947 %

Error absoluto medio = 4,02654%

El software permite también obtener una ecuación (**ecuación 2.1**), cuyos coeficientes se muestran en la **Tabla 3.7**, que describe el modelo creado y da soluciones para la variable dependiente en función de las combinaciones entre las variables independientes, sean o no significativas en la respuesta.

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tabla 3.7. Coeficientes de regresión de la ecuación propuesta para la variable Conversión.

Coeficiente	Estimado
Constante	90,8444
A: Temperatura	5,05833
B: Aceite/Etanol ratio	7,81944
C: pH	2,60417
AA	-6,41667
AB	-6,53333
AC	0,675
BC	-3,25417
CC	4,09583

La ecuación del modelo ajustado es:

$$\begin{aligned} [Conversion (\%) = 90.8444 + 5.0833 \times T + 7.81944 \times R + \\ 2.60417 \times pH - 6.41667 \times T^2 - 6.53333 \times T \times R + 0.675 \times \\ T \times pH - 3.25 \times R \times pH + 4.09583pH^2] \end{aligned} \quad (3.1)$$

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

En la siguiente **Tabla 3.8**, se muestran los resultados estimados, usando la ecuación anterior, para la variable Conversión.

Si se considera ahora la posibilidad de excluir del modelo propuesto las variables que según el análisis ANOVA han resultado ser no significativas para explicar

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

la conversión, el modelo resultante quedaría simplificado y seguiría explicando en gran medida la variabilidad presente en los experimentos.

Para ello se han eliminado del modelo inicial todas las variables que no son estadísticamente significativas, permaneciendo por tanto sólo la temperatura, la relación aceite/etanol, la interacción de segundo orden Temperatura - Temperatura, así como la interacción de ésta con el Ratio aceite/alcohol y la interacción del Ratio aceite/alcohol-pH. De esta forma se obtienen nuevos datos que nos permiten obtener un modelo más simplificado, como se muestra en las **Tablas 3.9 á 3.11**.

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tabla 3.8. Resultados Estimados para la variable Conversión.

Fila	Valores observados	Valores ajustados
1	100,0	82,9611
2	100,0	96,4292
3	100,0	94,7792
4	94,9	93,6583
5	86,1	90,7083
6	89,5	92,9153
7	100,0	98,7653
8	63,6	63,8653
9	84,6	85,6986
10	100,0	103,346
11	95,7	98,6
12	95,2	102,046
13	81,4	88,1361
14	59,1	64,9528
15	77,5	74,2319
16	100,0	99,0792
17	78,6	81,1986
18	100,0	94,8292
19	80,1	81,3264
20	100,0	94,9569
21	82,2	88,2639
22	100,0	83,0889
23	90,3	93,0431
24	86,9	90,8361
25	97,0	102,174
26	64,4	63,9931
27	100,0	96,5569
28	100,0	99,2069
29	100,0	94,9069
30	96,5	98,7278
31	100,0	98,8931
32	95,8	93,7861
33	100,0	103,474
34	85,4	85,8264
35	69,7	74,3597
36	60,2	65,0806

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tabla 3.9. Efectos estimados para la variable Conversión (tras excluir variables no significativas).

Efecto	Estimado	Error Estándar	V.I.F.
Promedio	93,575	1,98344	
A:Temperatura	10,1167	2,80501	1,0
B:Aceite/Etanol ratio	15,6389	2,29028	1,0
AA	-12,8333	4,85841	1,0
AB	-13,0667	2,80501	1,0
BC	-6,50833	2,80501	1,0
Bloque	0,127778	2,29028	1,0

Errores estándar basados en el error total con 29 g.l.

Tabla 3.10. Análisis de Varianza (ANOVA) para la variable Conversión (tras excluir variables no significativas).

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Temperatura	614,082	1	614,082	13,01	0,0012
B:Aceite/Etanol ratio	2201,17	1	2201,17	46,63	0,0000
AA	329,389	1	329,389	6,98	0,0132
AB	1024,43	1	1024,43	21,70	0,0001
BC	254,15	1	254,15	5,38	0,0276
Bloques	0,146944	1	0,146944	0,00	0,9559
Error total	1369,04	29	47,2083		
Total (correlación)	5792,41	35			

$R^2 = 76,3649 \%$

R^2 (ajustada por g.l.) = 72,4257 %

Error estándar del estimado = 6,87083 %

Error absoluto medio = 4,92446 %

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

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

Tabla 3.11. Coeficientes de regresión de la ecuación propuesta para la variable Conversión (tras excluir variables no significativas).

Coeficiente	Estimado
Constante	93,575
A:Temperatura	5,05833
B:Aceite/Etanol ratio	7,81944
AA	-6,41667
AB	-6,53333
BC	-3,25417

La ecuación simplificada (**ecuación 3.2**) del nuevo modelo ajustado es:

$$[Conversion (\%) = 93.57 + 5.06 \times T + 7.82 \times R - 6.42 \times T^2 - 6.53 \times T \times R - 3.25 \times R \times pH] \quad (3.2)$$

T; Temperatura

pH; pH

R; Aceite/Etanol ratio

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

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

▪ RESULTADOS PARA SELECTIVIDAD.

En la **Tabla 3.12** se muestran los valores de los efectos de todas las variables así como los errores estándar en su determinación y los coeficientes V.I.F, que al tener todos un valor de 1, es indicativo de que el modelo es perfectamente ortogonal y por tanto analizable mediante este método.

En la siguiente **Tabla 3.13**, se muestran los resultados del análisis de varianza (ANOVA) llevado a cabo con los datos experimentales obtenidos para el modelo anteriormente diseñado. Se destacan en cursiva los valores con un valor $P < 0.05$, los cuales indican que esa interacción entre variables tiene un efecto significativo sobre la conversión. En este caso, se ha encontrado que todas las variables estudiadas tienen un efecto significativo sobre la Selectividad, no siendo así para las interacciones de segundo orden entre las variables, excepto la interacción pH - pH, que sí es estadísticamente significativa.

Tabla 3.12. Efectos estimados para la variable Selectividad.

Efecto	Estimado	Error Estándar	V.I.F.
Promedio	34,2111	1,9457	
A:Temperatura	12,525	2,13141	1,0
B:pH	-4,5	2,13141	1,0
C:Aceite/Etanol ratio	9,00556	1,74029	1,0
AA	5,29167	3,69171	1,0
AB	13,8625	2,61043	1,0
AC	-24,4417	2,13141	1,0
BB	12,2667	3,69171	1,0
BC	-13,2167	2,13141	1,0
Bloque	-0,616667	1,74029	1,0

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

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

En la **Tabla 3.14** se pueden ver los coeficientes de la ecuación propuesta por el software para describir el modelo creado y las soluciones para la variable dependiente en función de las combinaciones entre las variables independientes, sean o no significativas en la respuesta.

Tabla 3.13. Análisis de Varianza (ANOVA) para la variable Selectividad.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Temperatura	941,254	1	941,254	34,53	0,0000
B:pH	121,5	1	121,5	4,46	0,0445
C: Aceite/Etanol ratio	729,9	1	729,9	26,78	0,0000
AA	56,0035	1	56,0035	2,05	0,1637
AB	768,676	1	768,676	28,20	0,0000
AC	3584,37	1	3584,37	131,50	0,0000
BB	300,942	1	300,942	11,04	0,0027
BC	1048,08	1	1048,08	38,45	0,0000
Bloques	3,4225	1	3,4225	0,13	0,7259
Error total	708,693	26	27,2574		
Total (correlación)	8262,84	35			

$R^2 = 91,4231 \%$

R^2 (ajustada por g.l.) = 88,8818 %

Error estándar del estimado = 5,22086 %

Error absoluto medio = 2,95347 %

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tabla 3.14. Coeficientes de regresión para la Selectividad.

Coeficiente	Estimado
Constante	34,2111
A:Temperatura	6,2625
B:pH	-2,25
C: Aceite/Etanol ratio	4,50278
AA	2,64583
AB	6,93125
AC	-12,2208
BB	6,13333
BC	-6,60833

La ecuación (**ecuación 3.3.**) del modelo ajustado es:

$$\begin{aligned}
 [Selectivity (\%) = & 34.2111 + 6.2625 \times T - 2.25 \times pH + 4.50278 \times R + \\
 & 2.64583 \times T^2 + 6.93125 \times T \times pH - 12.2208 \times T \times R + 6.13333 \times pH^2 - \\
 & 6.60833 \times pH \times R] \quad (3.3)
 \end{aligned}$$

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

En la **Tabla 3.15**, se pueden observar los resultados calculados al introducir las variables utilizadas en cada experimento en la ecuación que describe al modelo anteriormente obtenido, así como el resultado experimental. La comparación entre ambos nos ofrece una idea clara de cómo el modelo explica la observación experimental.

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Como se puede ver en la **Tabla 3.13**, donde las variables que tienen un efecto significativo en la Selectividad están marcadas en cursiva, no todas las variables tenidas en cuenta en el análisis de los datos tienen un efecto significativo en la variable de salida en estudio. Es por ello, por lo que en este caso, como en el anterior, referido a la variable de salida Conversión, se puede rehacer el modelo eliminando las variables que no ejercen un efecto significativo en la Selectividad, simplificando de esta forma el modelo que describe al sistema estudiado.

Para ello, se han eliminado del modelo inicial la interacciones de segundo orden entre la temperatura. De esta forma se obtiene un nuevo modelo más simplificado, como se muestra en las **Tablas 3.16 a 3.19**.

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tabla 3. 15. Resultados Estimados para la variable Selectividad.

Fila	Valores observados	Valores ajustados
1	17,8	17,7396
2	29,2	31,7917
3	11,7	14,1792
4	23,3	22,8854
5	45,9	51,1458
6	46,6	43,7701
7	37,5	36,2972
8	72,5	68,5687
9	52,6	54,0139
10	70,9	69,5493
11	39,6	39,916
12	46,1	45,9896
13	34,1	40,5083
14	31,4	39,0222
15	40,4	37,9701
16	44,2	30,0167
17	46,8	47,6264
18	36,1	35,7097
19	47,5	43,1535
20	51,9	53,3972
21	38,8	39,2993
22	22,6	22,2688
23	71,4	67,9521
24	33,4	35,0931
25	28,6	31,175
26	43,4	29,4
27	43,4	45,3729
28	69,6	68,9326
29	39,7	37,3535
30	33,4	39,8917
31	11,0	13,5625
32	45,2	50,5292
33	46,1	47,0097
34	36,5	38,4056
35	36,8	35,6806
36	16,3	17,1229

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tabla 3.16. Efectos estimados para la variable Selectividad (tras excluir variables no significativas).

Efecto	Estimado	Error Estándar	V.I.F.
Promedio	35,975	1,53629	
A:Temperatura	12,525	2,17264	1,0
B:pH	-4,5	2,17264	1,0
C: Aceite/Etanol ratio	9,00556	1,77395	1,0
AB	13,8625	2,66093	1,0
AC	-24,4417	2,17264	1,0
BB	12,2667	3,76312	1,0
BC	-13,2167	2,17264	1,0
Bloque	-0,616667	1,77395	1,0

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

Tabla 3.17. Análisis de Varianza (ANOVA) para la variable Selectividad (tras excluir variables no significativas).

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Temperatura	941,254	1	941,254	33,23	0,0000
B:pH	121,5	1	121,5	4,29	0,0480
C: Aceite/Etanol ratio	729,9	1	729,9	25,77	0,0000
AB	768,676	1	768,676	27,14	0,0000
AC	3584,37	1	3584,37	126,56	0,0000
BB	300,942	1	300,942	10,63	0,0030
BC	1048,08	1	1048,08	37,01	0,0000
Bloques	3,4225	1	3,4225	0,12	0,7308
Error total	764,697	27	28,3221		
Total (correlación)	8262,84	35			

$R^2 = 90,7454 \%$

R^2 (ajustada por g.l.) = 88,4317 %

Error estándar del estimado = 5,32185 %

Error absoluto medio = 3,3245 %

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tabla 3.18. Coeficientes de regresión para la variable Selectividad (tras excluir variables no significativas).

Coeficiente	Estimado
Constante	35,975
A:Temperatura	6,2625
B:pH	-2,25
C:Aceite/Etanol ratio	4,50278
AB	6,93125
AC	-12,2208
BB	6,13333
BC	-6,60833

La ecuación (**ecuación 3.4.**) simplificada del nuevo modelo ajustado es:

$$[Selectivity (\%) = 35.97 + 6.26 \times T - 2.25 \times pH + 4.50 \times R + 6.93 \times T \times pH - 12.22 \times T \times R + 6.13 \times pH^2 - 6.61 \times pH \times R] \quad (3.4)$$

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

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

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

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

▪ RESULTADOS PARA VISCOSIDAD CINEMÁTICA.

Se ha estudiado también la influencia de los principales parámetros de reacción en la viscosidad cinemática del biocombustible obtenido. Para ello se han realizado una serie de 18 experimentos (los mismos que para las variables de salida Conversión y Selectividad, **Tabla 3.4**) siguiendo un diseño experimental multifactorial, que mediante un análisis de la varianza, permitirá obtener la relación entre los principales parámetros de reacción (temperatura, pH y relación aceite/etanol) y la variable de salida Viscosidad cinemática.

En la **Tabla 3.20** se muestran los resultados del análisis donde se pueden observar los efectos de todas las variables así como los errores estándar en su determinación y los coeficientes V.I.F., que al tener todos un valor de 1 indican que el modelo es perfectamente ortogonal y por tanto analizable mediante éste método.

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

Tabla 3.20. Efectos estimados para la variable de salida Viscosidad cinemática.

Efecto	Estimado	Error Estándar	V.I.F.
Promedio	17,7028	0,379727	
A: Temperatura	3,30833	0,41597	1,0
B: Aceite/Etanol ratio	-4,64444	0,339638	1,0
C: pH	0,716667	0,41597	1,0
AA	1,94167	0,720481	1,0
AB	3,89167	0,41597	1,0
AC	0,1125	0,509457	1,0
BB	2,4	0,41597	1,0
BC	-1,28333	0,720481	1,0
Bloque	-0,222222	0,339638	1,0

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

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

En la siguiente **Tabla 3.21**, se muestran los resultados del análisis de varianza (ANOVA) llevado a cabo con los datos experimentales obtenidos para el modelo anteriormente diseñado. Se destacan en cursiva los valores con un valor $P < 0.05$, los cuales indican que esa interacción entre variables tiene un efecto significativo sobre la conversión. En este caso, se ha obtenido que únicamente las variables relación aceite/etanol y la interacción de segundo orden de la variable pH, tienen efectos significativos en la viscosidad cinemática.

Tabla 3.21. Análisis de Varianza (ANOVA) para la variable de salida Viscosidad cinemática.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Temperatura	65,6704	1	65,6704	63,25	<i>0,0000</i>
B: Aceite/Etanol ratio	194,138	1	194,138	187,00	<i>0,0000</i>
C: pH	3,08167	1	3,08167	2,97	0,0968
AA	7,54014	1	7,54014	7,26	<i>0,0122</i>
AB	90,8704	1	90,8704	87,53	<i>0,0000</i>
AC	0,050625	1	0,050625	0,05	0,8270
BB	34,56	1	34,56	33,29	<i>0,0000</i>
BC	3,29389	1	3,29389	3,17	0,0866
Bloques	0,444444	1	0,444444	0,43	0,5187
Error total	26,9928	26	1,03819		
Total (correlación)	426,642	35			

$$R^2 = 93,6732 \%$$

$$R^2 \text{ (ajustada por g.l.)} = 91,7986 \%$$

$$\text{Error estándar del estimado} = 1,01891 \%$$

$$\text{Error absoluto medio} = 0,711574 \%$$

A continuación se muestra la **Tabla 3.22**, donde se pueden ver los coeficientes de la ecuación propuesta por el software para describir el modelo creado y que da

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

soluciones para la variable dependiente en función de las combinaciones entre las variables independientes, sean o no significativas en la respuesta.

Tabla 3.22. Coeficientes de regresión para la variable de salida Viscosidad cinemática.

Coeficiente	Estimado
Constante	17,7028
A:Temperatura	1,65417
B: Aceite/Etanol ratio	-2,32222
C:pH	0,358333
AA	0,970833
AB	1,94583
AC	0,05625
BB	1,2
BC	-0,641667

La ecuación (**ecuación 3.5**) del modelo ajustado es:

$$[\text{Viscosity (cSt)} = 17.7028 + 1.65417 \times T - 2.32222 \times R + 0.358333 \times \text{pH} + 0.970833 \times T^2 + 1.94583 \times T \times R + 0.05625 \times T \times \text{pH} + 1.20 \times R \times \text{pH} - 0.641667 \times \text{pH}^2] \quad (3.5)$$

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

En la siguiente **Tabla 3.23** se muestran los valores experimentales obtenidos para cada reacción del diseño experimental para la viscosidad cinemática a 40 °C frente a los valores ajustados por el modelo obtenido, observándose las diferencias entre los valores reales y ajustados según el modelo.

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tabla 3.23. Resultados Estimados para la variable de salida Viscosidad cinemática.

Fila	Valores observados	Valores ajustados
1	19,8	20,0625
2	13,4	12,8625
3	20,3	20,8153
4	20,8	21,3986
5	13,3	13,7229
6	21,0	20,3361
7	15,7	16,4083
8	15,2	15,4917
9	21,3	20,959
10	18,6	19,3882
11	20,2	19,859
12	12,5	13,2917
13	18,2	17,8063
14	20,1	20,1361
15	19,0	18,6528
16	22,1	21,6549
17	10,8	10,7188
18	22,3	21,0354
19	20,6	19,6368
20	13,2	13,5007
21	14,5	13,0694
22	13,4	12,6403
23	16,2	17,584
24	20,1	21,4326
25	19,0	20,1139
26	21,6	20,7368
27	19,5	19,8403
28	18,1	18,4306
29	20,3	21,1764
30	10,9	10,4965
31	15,1	16,1861
32	20,3	20,5931
33	18,5	19,166
34	22,2	20,8132
35	22,5	19,9139
36	14,6	15,2694

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Para simplificar el resultado, se han eliminado del modelo inicial la variable pH y las interacciones de segundo orden entre dicha variables pH – pH, así como la interacción ratio aceite/alcohol-pH, ya que según el análisis ANOVA, son estos los efectos no significativos para esta variable de salida. De esta forma se obtiene un nuevo modelo más simplificado, como se muestra en las **Tablas 3.24 a 3.26**.

Tabla 3.24. Efectos estimados para la variable Viscosidad cinemática (tras excluir variables no significativas).

Efecto	Estimado	Error Estándar	V.I.F.
Promedio	17,275	0,30989	
A: Temperatura	3,30833	0,43825	1,0
B: Aceite/Etanol ratio	-4,64444	0,35783	1,0
AA	1,94167	0,759072	1,0
AB	3,89167	0,43825	1,0
BC	2,4	0,43825	1,0
Bloque	-0,222222	0,35783	1,0

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

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tabla 3.25. Análisis de Varianza (ANOVA) para la variable Viscosidad cinemática (tras excluir variables no significativas).

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Temperatura	65,6704	1	65,6704	56,99	0,0000
B: Aceite/Etanol ratio	194,138	1	194,138	168,47	0,0000
AA	7,54014	1	7,54014	6,54	0,0160
AB	90,8704	1	90,8704	78,85	0,0000
BC	34,56	1	34,56	29,99	0,0000
Bloques	0,444444	1	0,444444	0,39	0,5394
Error total	33,419	29	1,15238		
Total (correlación)	426,642	35			

$R^2 = 92.167 \%$

R^2 (ajustada por g.l.) = 90.8615 %

Error estándar del estimado = 1.07349 %

Error absoluto medio = 0,68287 %

Tabla 3.26. Coeficientes de regresión para Viscosidad cinemática (tras excluir variables no significativas).

Coeficiente	Estimado
constante	17,275
A: Temperatura	1,65417
B: Aceite/Etanol ratio	-2,32222
AA	0,970833
AB	1,94583
BC	1,2

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

La ecuación simplificada (**ecuación 3.6**) del nuevo modelo ajustado es:

$$[\text{Viscosity}(cSt) = 17.27 + 1.65 \times T - 2.32 \times R + 0.97 \times T^2 + 1.95 \times T \times R + 1.20 \times R \times pH] \quad (3.6)$$

T; Temperatura
pH; pH
R; Aceite/Etanol

Se puede observar cómo al eliminar del modelo las variables no significativas, el sistema queda descrito por una ecuación mucho más simple y que continúa explicando poco más del 90 % de la variabilidad producida en los experimentos.

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

b) EFECTO DE LA CANTIDAD DE LIPASA.

El efecto de la cantidad de lipasa en el medio de reacción es muy importante para seleccionar las condiciones de reacción óptimas. Este parámetro se evaluó con el fin de elegir la cantidad necesaria de lipasa que maximiza el rendimiento sin limitaciones de transferencia de masa. Se aplicarán los valores optimizados anteriores

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

obtenidos por la RSM para las demás condiciones de reacción (12 ml de aceite / 3.5 ml de EtOH, 30 °C, 12,5 µl de disolución de NaOH 10 N, mayor agitación de 300 rpm, durante 2 h).

Se puede comprobar en la **Tabla 3.27** la forma en que se ha mejorado el rendimiento y la viscosidad de reacción, por lo que mejores valores de rendimiento podrían ser obtenidos utilizando más cantidades de biocatalizador, sin embargo elevadas cantidades de enzima tendrían un efecto perjudicial sobre la economía del proceso.

Tabla 3.27. Influencia de la cantidad de lipasa N435 (CALB) en el rendimiento de reacciones de etanolisis, desarrollada bajo condiciones estándar. (12 ml de aceite / 3.5 ml de EtOH, 30 °C, 12,5 µl de disolución de NaOH 10 N, mayor agitación de 300 rpm, durante 2 h)

Muestra	Cantidad de Lipasa (g)	Visc 40 °C (cSt)	Sel (%)	Conv (%)
ACEITE DE GIRASOL	0	34.53	3.45	33.32
BLANCO ⁰	0	13.42	16.24	28.82
R1	0.05	23.3	9.7	11.8
R2	0.1	20.3	11.9	15.9
R3	0.2	19.2	16.1	17.7
R4	0.3	15.6	18.1	20.7
R5	0.4	10.5	27.7	29.9
R6	0.5	7.7	34.1	47.1

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

c) ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DEL SISTEMA ENZIMÁTICO N435 EN REACCIONES SUCESIVAS.

Al mismo tiempo que se desarrollan estas reacciones sucesivas, se ha ido cambiando las condiciones de reacción. Este procedimiento en conjunto estaría de acuerdo con la metodología OVAT ("Variable At One Time"), según la cual se establecen las condiciones iniciales y se han modificado las variables a estudiar una por una. Este método no proporciona información sobre el efecto combinado de varios parámetros de la reacción, pero es útil para determinar la influencia de variables aisladas. En base a resultados previos obtenidos con otras lipasas (Caballero et al., 2009; C. Luna et al., 2013; C. Luna, Verdugo, et al., 2014a; D. Luna et al., 2012; C. Verdugo et al., 2010) y cuáles fueron las variables de reacción más influyentes, se decidió utilizar esta metodología experimental para evaluar con más detalle la influencia de estas variables en los intervalos seleccionados para cada estudio.

Las reacciones con el sistema biocatalítico de lipasa N435 se han llevado a cabo en las condiciones óptimas (pH, temperatura y proporción relativa de aceite / etanol) previamente determinadas por los estudios de RSM. Estas condiciones experimentales fueron similares a los anteriormente empleadas con la lipasa de *Thermomyces lanuginosus*, Lipopan 50 BG Lipopan (Cristobal Verdugo et al., 2011). En este sentido, la **Tabla 3.28** muestra una recopilación de los resultados obtenidos en la reacción de transesterificación selectiva con el biocatalizador N435. Así, además de obtener información específica acerca de la influencia de ciertos parámetros (pH, temperatura, etc.) sobre el comportamiento de la N435, también se valora su capacidad para ser reutilizado.

Con lo cual, a partir de la Conversión, obtenida a partir de 0,01 mol de TG, con tiempo de reacción de 2 h, empleando 0,5 g de biocatalizador (lipasa CALB inmovilizada en polímero acrílico) se puede calcular la capacidad enzimática de

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

transformación: "Turn Over Frequency" (número TOF), expresada en moles de TG transformadas por minuto y por gramo de catalizador (lipasa soportada). Con el fin de ser capaz de obtener la actividad enzimática de la CALB inmovilizada, se ha llevado a cabo algunos experimentos, operando bajo idénticas condiciones experimentales, utilizando 0,01 g de la lipasa B de *Candida antarctica*, recombinante obtenida a partir de *Aspergillus oryzae*, en polvo. Es decir, CALB purificada y en forma libre, habiéndose obtenido que la conversión de esta cantidad de lipasa pura de referencia es 50,6%. Teniendo en cuenta que 0,5 g de enzima inmovilizada produjo una conversión de 47,7%, se puede inferir que N435 tiene una actividad catalítica correspondiente al 1,9% de la actividad catalítica obtenida por la CALB pura. Por lo tanto, suponiendo que la actividad de la enzima inmovilizada es similar a la de la enzima libre, se puede considerar que el N435 contiene un 1,9% en peso de enzima inmovilizada. Con estos parámetros, la actividad catalítica de las enzimas inmovilizadas, expresada en mg de enzima requerida para convertir 1 μ mol de TG por minuto (U / mg) también se puede calcular.

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tabla 3.28. Viscosidad, conversión, selectividad, del biodiésel obtenido, así como las velocidades de conversión, en forma de "Turn Over Frecuencias" (TOF) en $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g cat}^{-1}$ y como actividades enzimáticas (U / mg) del sistema biocatalítico N435, operando con un tiempo de reacción de 2 h, empleando 0,5 g de biocatalizador, en función de las condiciones de reacción aplicadas, con diferentes cantidades de aceite de girasol y de etanol absoluto, a diferentes temperaturas y bajo condiciones ligeramente alcalinas, obtenidas por la adición de diferentes cantidades de disolución acuosa de NaOH 10N.

Reac. N ^a	NaOH (μl)	Temp. ($^{\circ}\text{C}$)	EtOH/Oil (ml); (molar ratio)	Visc (cSt)	Sel (%)	Conv (%)	TOF	Activity (U/mg)
1	25	30	3.5/12 (6:1)	10.5	34.9	47.7	79.5	0.24
2	25	30	3.5/12 (6:1)	13.7	23.6	32.9	54.83	0.35
3	25	30	3.5/12 (6:1)	12.8	24.1	31.8	53.00	0.36
4	25	30	3.5/12 (6:1)	13.3	25.6	33.9	56.50	0.33
5	25	30	3.5/12 (6:1)	12.8	29.1	35.6	59.33	0.32
6	12.5	35	3.5/12 (6:1)	13.8	14.5	20.1	33.50	0.57
7	12.5	30	3.5/12 (6:1)	12.3	45.4	57.9	96.50	0.20
8	12.5	25	3.5/12 (6:1)	14.6	21.4	25.8	43.00	0.44
9	12.5	40	3.5/12 (6:1)	20.9	7.6	4.0	6.67	2.85
10	12.5	30	1.75/12 (3:1)	18,8	17,9	27,4	45.67	0.42
11	12.5	20	3.5/12 (6:1)	18.1	17.5	22.4	37.33	0.51
12	12.5	30	2.3/12 (4:1)	20.0	17.6	21.4	35.67	0.53
13	12.5	30	2.9/12 (5:1)	10.6	34.1	47.7	79.50	0.24
14	12.5	30	3.5/12 (6:1)	10.4	39.1	51.9	86.50	0.22
15	12.5	30	4.1/12 (7:1)	17.9	14.1	16.8	28.00	0.68
16	12.5	30	4.7/12 (8:1)	16.3	17.1	21.8	36.33	0.52

3.2.2. CALB INMOVILIZADA EN FORMA NO COVALENTE. (mediante adsorción física)

Se ha evaluado cómo evoluciona el rendimiento a lo largo del tiempo en la reacción de transesterificación selectiva de aceite de girasol con etanol, para obtener Ecodiésel (FAEE + MG) empleando el sistema biocatalítico conformado por la lipasa CALB comercial inmovilizada en soportes inorgánicos, concretamente en materiales Mesoporosos Organosilíceos Ordenados (PMO) y sobre material silíceo amorfo MS-3030 funcionalizado con grupos octilo mediante el empleo de organosilanos (Blanco, Terreros, Fernandez-Perez, Otero, & Diaz-Gonzalez, 2004; Gascon, 2014).

También se comprobará la vigorosidad y estabilidad del sistema biocatalítico inmovilizado, al efectuarse varios ciclos de reacción sucesivos.

a) ESTUDIO DEL RENDIMIENTO DE REACCIÓN.

Tras aplicar las condiciones estándar de reacción óptimas, determinadas con otros sistemas enzimáticos (6 ml aceite/ 1.75 ml EtOH, 30 °C, 25 µL de NaOH 10 N, agitación mayor de 300 rpm, durante 10 h de reacción) (C. Luna, Verdugo, et al., 2014a; C. Luna, Verdugo, et al., 2014c; Cristobal Verdugo et al., 2011), se obtienen los resultados, recogidos en la **Tabla 3.29**. Se emplean 0.1 g de CALB/PMO y 0.05 g de CALB/MS3030 para conseguir operar con la misma carga enzimática, 0.01 g de CALB libre presente en el sistema N435 y en Lipopan 50BG ya estudiados.

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tabla 3.29. Conversión y viscosidad obtenidas en la reacción de transesterificación selectiva operando bajo condiciones de reacción estándares: 6 ml aceite, 1.75 ml EtOH, 30°C, 25 μ L NaOH 10 N, agitación mayor de 300 rpm, durante 10 h. empleando 0.1 g de CALB/PMO o 0.05 g de CALB/MS.

Muestra	Visc (cSt)	Conv (%)
ACEITE DE GIRASOL	34.5	33.3
BLANCO	13.4	28.8
BLANCO-PMO	14,98	22,41
BLANCO-MS3030	14,34	27,54
PMO/CALB	13,80	66,49
MS3030/CALB	12,58	88,86

La evolución de la conversión obtenida a lo largo del tiempo operando con los diferentes sistemas enzimáticos se recoge en la **Tabla 3.30**.

Tabla 3.30. Evolución del rendimiento de la reacción de transesterificación selectiva operando bajo condiciones de reacción estándar: 6 ml aceite, 1.75 ml EtOH, 30°C, 25 μ L NaOH 10 N, agitación mayor de 300 rpm, durante 10 h. empleando 0.1 g de CALB/PMO o 0.05 g de CALB/MS.

Tiempo (hora)	PMO	BL-PMO	MS3030	BL-MS3030
	Conv	Conv	Conv	Conv
0.5	34,62	20,26	15,25	14,65
1	34,34		75,71	
2	54,38		86,23	
3	62,12		91,77	
4	65,06	24,93	100	17,72
5	63,33		84,95	
6	60,56		80,22	
7	65,39		83,69	
8	69,28		91,46	
10	66,49	22,41	88,86	27,54

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

b) ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DEL SISTEMA ENZIMÁTICO EN REACCIONES SUCESIVAS.

Los resultados obtenidos operando en reacciones sucesivas con el mismo sistema biocatalítico son recogidos en la **Tabla 3.31**, lo que permite comprobar la estabilidad y eficiencia del sistema enzimático. En estos experimentos se ha reducido el tiempo de reacción a 3 horas, tiempo en el que, de acuerdo con la **Tabla 3.30** se alcanzan los niveles óptimos de rendimiento.

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tabla 3.31. Rendimiento de la reacción de transesterificación selectiva obtenida en sucesivas reutilizaciones del mismo sistema biocatalítico, bajo condiciones de reacción estándar: 6 ml aceite, 1.75 ml EtOH, 30°C, 25 µL NaOH 10 N, agitación mayor de 300 rpm, durante 3 h. empleando 0.1 g de CALB/PMO o 0.05 g de CALB/MS.

	Visc (cSt)	Conv (%)
ACEITE DE GIRASOL	34.5	33.3
BLANCO	13.4	28.8
BLANCO-PMO	14,98	22,41
BLANCO-MS3030	14,34	27,54
1ª Reacción:		
PMO/CALB	13,80	66,49
MS3030/CALB	12,58	88,86
2º Reuso:		
PMO/CALB-II	13,88	44,95
MS3030/CALB-II	12,42	58,43
3º Reuso:		
PMO/CALB-III	12,86	29,77
MS3030/CALB-III	12,62	40,02
4º Reuso:		
PMO/CALB-IV	12,09	47,73
MS3030/CALB-IV	11,85	52,02
5º Reuso:		
PMO/CALB-V	12,62	38,81
MS3030/CALB-V	12,41	53,02
6º Reuso:		
PMO/CALB-VI	13,14	38,84
MS3030/CALB-VI	12,25	57,96
7º Reuso:		
PMO/CALB-VII	11,77	34,55
MS3030/CALB-VII	12,46	43,19
8º Reuso:		
PMO/CALB-VIII	13,51	24,29
MS3030/CALB-VIII	12,86	44,96
9º Reuso:		
PMO/CALB-XI	17,16	23,73
MS3030/CALB-XI	14,24	25,39
10º Reuso:		
PMO/CALB-X	-----	27,09
MS3030/CALB-X	14,42	30,10

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

3.2.3. CEPA ESTÁNDAR DE *CANDIDA ANTARCTICA* DE LA C.E.C.T.

Se han realizado diversos estudios encaminados a dilucidar las condiciones óptimas de crecimiento y la capacidad transesterificadora de una cepa estándar adquirida en la C.E.C.T. (Colección Española de Cultivos Tipo) (H. S. Kim et al., 2002; Salis, Svensson, Monduzzi, Solinas, & Adlercreutz, 2003). También, se han evaluado como biocatalizadores en la reacción de transesterificación selectiva de aceite de girasol con etanol para obtener Ecodiésel (FAEE + MG).

a) MEDIDA DE LA CAPACIDAD TRANSESTERIFICADORA.

Operando como se establece en el apartado de metodología experimental **2.2.2.d**, se aplican las correspondientes expresiones para optimizar la elección del medio idóneo y el tiempo de cultivo del mismo más adecuado.

✓ Actividad Específica (μ moles PNP/h/mg prot).

$$\begin{aligned} \text{Actividad Específica (AE)} \\ &= \frac{[Ab (410 \text{ nm}) \times \text{Factor Dilución} \times \text{Vol total Muestra (PNPP + EtOH)}]}{\div [\varepsilon \times 1000 (\mu\text{moles})] \div n^\circ \text{ horas} \div [C(\text{mg/ml}) \times 0.9 \text{ ml}]} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Actividad Específica (AE)} \\ &= \frac{[Ab (410 \text{ nm}) \times 41 \times 1.06 \text{ ml}]}{\div [17600 \times 1000 (\mu\text{moles})] \div 13 \text{ horas}} \\ &\div [C(\text{mg/ml}) \times 0.9 \text{ ml}] \end{aligned}$$

$$FD = \frac{25 \mu\text{l Muestra}}{1 \text{ ml NaOH} + 25 \mu\text{l Muestra}} = 41$$

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

✓ **Actividad Enzimática Total (μmoles PNP/h/ml fracción)**

Actividad Enzimática Total (AT)

$$= \frac{[[Ab (410 \text{ nm}) \times \text{Factor Dilución} \times \text{Vol total Muestra (PNPP + EtOH)]]}{[\epsilon \times 1000 (\mu\text{moles})] \div n^{\circ} \text{ horas}} \div [0.9 \text{ ml}]$$

Actividad Enzimática Total (AT)do

$$= \frac{[[Ab (410 \text{ nm}) \times 41 \times 1.06 \text{ ml}]]}{[17600 \times 1000 (\mu\text{moles})] \div 13 \text{ horas}} \div [0.9 \text{ ml}]$$

i) 1ª Prueba:

μg/ml [BSA]	ABS (595 nm)
0	0
2	0,013
4	0,162
6	0,227
8	0,302
10	0,34
12	0,406

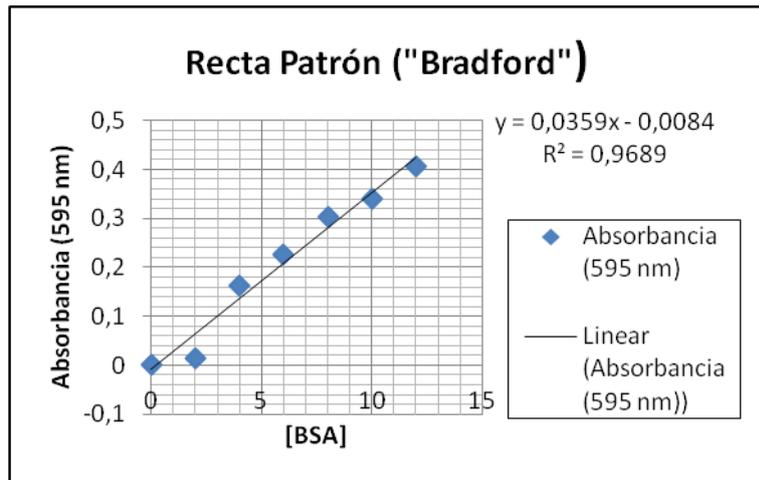


Figura 3.1. Gráfica patrón para cuantificar proteínas: cantidad de BSA (eje de ascisas) frente a la absorbancia obtenida a una longitud de onda de 595 nm (eje de ordenadas).

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tabla 3.32. Actividad Específica (μ moles PNP/h/mg prot), Actividad Enzimática Total (μ moles PNP/h/ml fracción) de cada medio de cultivo y a diferentes tiempos de crecimiento del cultivo de *C. antarctica* de la CECT.

	Abs (595 nm)	C (μ g/ml)	C(mg/ml)x FD	Abs (410 nm)	Actividad Específica (μ moles PNP/h/mg prot)	Actividad Enzimática Total (μ moles PNP/h/ml fracción)
48 h/EC						
PDB	0,028	1,01392758	0,01013928	0,082	1,7069E-06	1,73063E-07
MYA	0,036	1,2367688	0,01236769	0,08	1,3652E-06	1,68842E-07
MYA TB	0	0,23398329	0,00233983	0,045	4,059E-06	9,49738E-08
YPD	0,075	2,32311978	0,0232312	0,047	4,2699E-07	9,91948E-08
YPD TB	0,037	1,26462396	0,01264624	0	0	0
48 h/IC						
PDB	0,065	2,04456825	0,02044568	0	0	0
MYA	0	0,23398329	0,00233983	0	0	0
MYA TB	0,003	0,31754875	0,00317549	0	0	0
YPD	0,102	3,07520891	0,03075209	0,066	4,5296E-07	1,39295E-07
YPD TB	0,045	1,48746518	0,01487465	0,12	1,7027E-06	2,53263E-07
72 h/EC						
PDB	0,039	1,32033426	0,01320334	0	0	0
MYA	0,042	1,40389972	0,014039	0	0	0
MYA TB	0,061	1,93314763	0,01933148	0	0	0
YPD	0,046	1,51532033	0,0151532	0,116	1,6156E-06	2,44821E-07
YPD TB	0,041	1,37604457	0,01376045	0	0	0
72 h/IC						
PDB	0,04	1,34818942	0,01348189	0	0	0
MYA	0,049	1,59888579	0,01598886	0,015	1,98E-07	3,16579E-08
MYA TB	0,058	1,84958217	0,01849582	0,077	8,7863E-07	1,62511E-07
YPD	0,112	3,35376045	0,0335376	0,282	1,7746E-06	5,95169E-07
YPD TB	0,047	1,54317549	0,01543175	0,14	1,9147E-06	2,95474E-07
96 h/EC						
PDB	0,053	1,71030641	0,01710306	0	0	0
MYA	0,041	1,37604457	0,01376045	0	0	0
MYA TB	0,057	1,82172702	0,01821727	0	0	0
YPD	0,047	1,54317549	0,01543175	0	0	0
YPD TB	0,046	1,51532033	0,0151532	0	0	0

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tabla 3.32 (continuación).

96 h/IC						
PDB	0,048	1,57103064	0,01571031	0	0	0
MYA	0,054	1,73816156	0,01738162	0	0	0
MYA TB	0,06	1,90529248	0,01905292	0	0	0
YPD	0,024	0,90250696	0,00902507	0	0	0
YPD TB	0,06	1,90529248	0,01905292	0,101	1,1188E-06	2,13163E-07

ii) 2ª Prueba:

mg/ml [BSA]	ABS (595 nm)
0	0
2	0,014
4	0,198
6	0,365
8	0,436
10	0,545
12	0,599

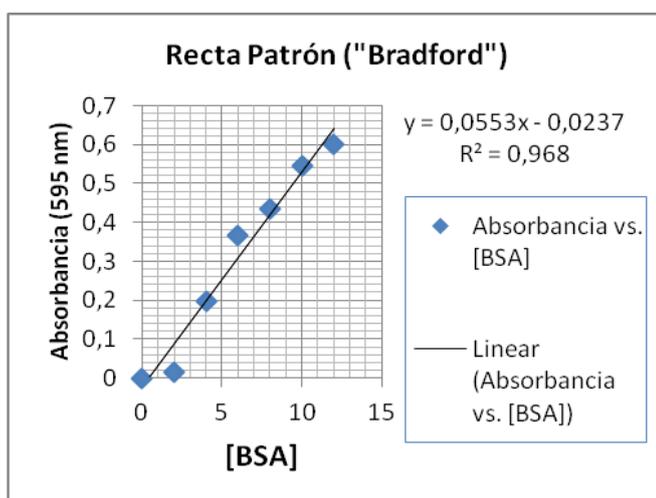


Figura 3.2. Gráfica patrón para cuantificar proteínas: cantidad de BSA (eje de ascisas) frente a la absorbancia obtenida a una longitud de onda de 595 nm (eje de ordenadas).

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tabla 3.33. Actividad Específica (μ moles PNP/h/mg prot), Actividad Enzimática Total (μ moles PNP/h/ml fracción) de cada medio de cultivo y a diferentes tiempos de crecimiento del cultivo de *C. antarctica* de la CECT.

	Abs (595 nm)	C (μ g/ml)	C(mg/ml)xFD	Abs (410 nm)	Actividad Específica (μ moles PNP/h/mg prot)	Actividad Enzimática Total (μ moles PNP/h/ml fracción)
24 h/EC						
PDB	0,041	1,37604457	0,01376045	0,008	1,227E-07	1,6884E-08
PDB TB	0,031	1,09749304	0,01097493	0,02	3,8461E-07	4,2211E-08
MYA TB	0,027	0,98607242	0,00986072	0,016	3,4245E-07	3,3768E-08
YPD	0,085	2,60167131	0,02601671	0,019	1,5413E-07	4,01E-08
YPD TB	0,042	1,40389972	0,014039	0,013	1,9543E-07	2,7437E-08
24 h/C						
PDB	0,041	1,37604457	0,01376045	0,036	5,5216E-07	7,5979E-08
PDB TB	0,022	0,84679666	0,00846797	0,011	2,7416E-07	2,3216E-08
MYA TB	0	0,23398329	0,00233983	0,01	9,02E-07	2,1105E-08
YPD	0,196	5,69359331	0,05693593	0,015	5,5603E-08	3,1658E-08
YPD TB	0,038	1,29247911	0,01292479	0,011	1,7962E-07	2,3216E-08
48 h/EC						
PDB	0,011	0,54038997	0,0054039	0,032	1,2498E-06	6,7537E-08
PDB TB	0,034	1,1810585	0,01181058	0,047	8,3988E-07	9,9195E-08
MYA TB	0,026	0,95821727	0,00958217	0,043	9,471E-07	9,0753E-08
YPD	0,047	1,54317549	0,01543175	0,054	7,3853E-07	1,1397E-07
YPD TB	0,107	3,21448468	0,03214485	0,042	2,7576E-07	8,8642E-08
48 h/C						
PDB	0,045	1,48746518	0,01487465	0,04	5,6755E-07	8,4421E-08
PDB TB	0,042	1,40389972	0,014039	0,07	1,0523E-06	1,4774E-07
MYA TB	0	0,23398329	0,00233983	0,025	2,255E-06	5,2763E-08
YPD	0,067	2,10027855	0,02100279	0,046	4,6224E-07	9,7084E-08
YPD TB	0,057	1,82172702	0,01821727	0,03	3,4756E-07	6,3316E-08
72 h/EC						
PDB	0,026	0,95821727	0,00958217	0,024	5,2861E-07	5,0653E-08
PDB TB	0,031	1,09749304	0,01097493	0,024	4,6153E-07	5,0653E-08
MYA TB	0,044	1,45961003	0,0145961	0,033	4,7716E-07	6,9647E-08
YPD	0,071	2,21169916	0,02211699	0,048	4,5804E-07	1,0131E-07
YPD TB	0,039	1,32033426	0,01320334	0,034	5,4348E-07	7,1758E-08

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tabla 3.33 (continuación).

72 h/IC						
PDB	0	0,23398329	0,00233983	0,014	1,2628E-06	2,9547E-08
PDB TB	0,03	1,06963788	0,01069638	0,052	1,026E-06	1,0975E-07
MYA TB	0,029	1,04178273	0,01041783	0,037	7,4958E-07	7,809E-08
YPD	0,325	9,28690808	0,09286908	0,086	1,9544E-07	1,8151E-07
YPD TB	0,166	4,85793872	0,04857939	0,171	7,4291E-07	3,609E-07

iii) 3ª Prueba:

mg/ml [BSA]	ABS (595 nm)
0	0
2	0,001
4	0,021
6	0,07
8	0,324
10	0,413
12	0,432

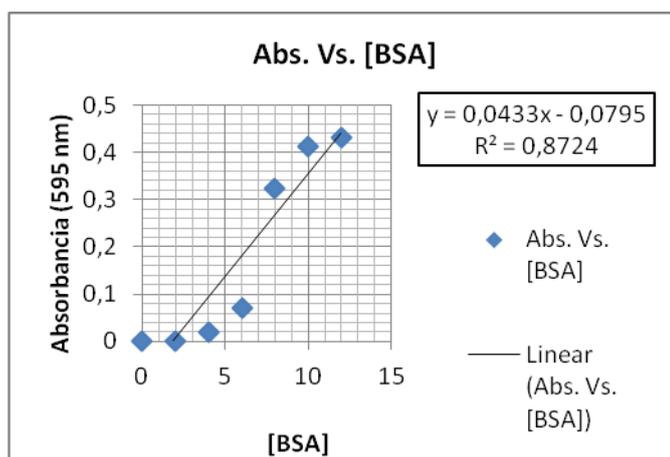


Figura 3.3. Gráfica patrón para cuantificar proteínas: cantidad de BSA (eje de ascisas) frente a la absorbancia obtenida a una longitud de onda de 595 nm (eje de ordenadas).

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tabla 3.34. Actividad Específica (μ moles PNP/h/mg prot), Actividad Enzimática Total (μ moles PNP/h/ml fracción) de cada medio de cultivo y a diferentes tiempos de crecimiento del cultivo de *C. antarctica* de la CECT.

	Abs (595 nm)	C (μ g/ml)	C(mg/ml)xFD	Abs (410 nm)	Actidad Específica (μ moles PNP/h/mg prot)	Actividad Total (μ moles PNP/h/ml fracción)
24 h/EC						
PDB	0,03	1,06963788	0,01069638	0,004	5,70014E-08	6,09708E-09
PDB TB	0,005	0,37325905	0,00373259	0,008	3,26694E-07	1,21942E-08
MYA	0,012	0,56824513	0,00568245	0,004	1,07297E-07	6,09708E-09
MYA TB	0,003	0,31754875	0,00317549	0	0	0
YPD	0,037	1,26462396	0,01264624	0,005	6,02658E-08	7,62135E-09
YPD TB	0,006	0,40111421	0,00401114	0,008	3,04007E-07	1,21942E-08
YPL	0	0,23398329	0,00233983	0,111	7,23103E-06	1,69194E-07
YPL TB	0,015	0,65181058	0,00651811	0,012	2,80622E-07	1,82912E-08
24 h/IC						
PDB	0,003	0,31754875	0,00317549	0,005	2,40006E-07	7,62135E-09
PDB TB	0,01	0,51253482	0,00512535	0,015	4,46098E-07	2,28641E-08
MYA	0,022	0,84679666	0,00846797	0,004	7,20017E-08	6,09708E-09
MYA TB	0,02	0,79108635	0,00791086	0,014	2,69753E-07	2,13398E-08
YPD	0,133	3,93871866	0,03938719	0,034	1,31579E-07	5,18252E-08
YPD TB	0,156	4,57938719	0,04579387	0,024	7,98851E-08	3,65825E-08
YPL	0,041	1,37604457	0,01376045	0,078	8,64021E-07	1,18893E-07
YPL TB	0,152	4,46796657	0,04467967	0,081	2,76336E-07	1,23466E-07
48 h/EC						
PDB	0,003	0,31754875	0,00317549	0	0	0
PDB TB	0,003	0,31754875	0,00317549	0,014	6,72016E-07	2,13398E-08
MYA	0,014	0,62395543	0,00623955	0,066	1,61232E-06	1,00602E-07
MYA TB	0,002	0,28969359	0,00289694	0,04	2,10467E-06	6,09708E-08
YPD	0,015	0,65181058	0,00651811	0,073	1,70712E-06	1,11272E-07
YPD TB	0,005	0,37325905	0,00373259	0,036	1,47012E-06	5,48737E-08
YPL	0	0,23398329	0,00233983	0,061	3,97381E-06	9,29805E-08
YPL TB	0,06	1,90529248	0,01905292	0,066	5,28013E-07	1,00602E-07

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tabla 3.34 (continuación).

48 h/IC						
PDB	0,07	2,18384401	0,02183844	0,071	4,95563E-07	1,08223E-07
PDB TB	0	0,23398329	0,00233983	0,077	5,01612E-06	1,17369E-07
MYA	0,015	0,65181058	0,00651811	0,078	1,82404E-06	1,18893E-07
MYA TB	0,016	0,67966574	0,00679666	0,005	1,12134E-07	7,62135E-09
YPD	0,229	6,61281337	0,06612813	0,067	1,54437E-07	1,02126E-07
YPD TB	0,097	2,93593315	0,02935933	0,027	1,40178E-07	4,11553E-08
YPL	0,417	11,8495822	0,11849582	0,037	4,75949E-08	5,6398E-08
YPL TB	0,342	9,76044568	0,09760446	0,113	1,7647E-07	1,72243E-07
72 h/EC						
PDB	0,004	0,3454039	0,00345404	0	0	0
PDB TB	0	0,23398329	0,00233983	0	0	0
MYA	0	0,23398329	0,00233983	0,007	4,56011E-07	1,06699E-08
MYA TB	0	0,23398329	0,00233983	0,006	3,90867E-07	9,14562E-09
YPD	0,007	0,42896936	0,00428969	0,018	6,396E-07	2,74369E-08
YPD TB	0,019	0,7632312	0,00763231	0	0	0
YPL	0,407	11,5710306	0,11571031	0,084	1,10655E-07	1,28039E-07
YPL TB	0,067	2,10027855	0,02100279	0,041	2,97556E-07	6,24951E-08
72 h/IC						
PDB	0,006	0,40111421	0,00401114	0,011	4,1801E-07	1,6767E-08
PDB TB	0,013	0,59610028	0,005961	0,017	4,34702E-07	2,59126E-08
MYA	0,043	1,43175487	0,01431755	0,032	3,40677E-07	4,87767E-08
MYA TB	0,01	0,51253482	0,00512535	0,006	1,78439E-07	9,14562E-09
YPD	0,405	11,5153203	0,1151532	0,018	2,38264E-08	2,74369E-08
YPD TB	0,163	4,77437326	0,04774373	0	0	0
YPL	0,518	14,6629526	0,14662953	0,084	8,73212E-08	1,28039E-07
YPL TB	0,441	12,5181058	0,12518106	0,041	4,99238E-08	6,24951E-08
96 h/EC						
PDB	0	0,23398329	0,00233983	0,004	2,60578E-07	6,09708E-09
PDB TB	0	0,23398329	0,00233983	0,01	6,51444E-07	1,52427E-08
MYA	0	0,23398329	0,00233983	0,004	2,60578E-07	6,09708E-09
MYA TB	0	0,23398329	0,00233983	0	0	0
YPD	0,011	0,54038997	0,0054039	0,018	5,07723E-07	2,74369E-08
YPD TB	0	0,23398329	0,00233983	0	0	0
YPL	0,145	4,2729805	0,04272981	0,111	3,95963E-07	1,69194E-07
YPL TB	0,284	8,1448468	0,08144847	0,029	5,42722E-08	4,42038E-08

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tabla 3.34 (continuación).

96 h/IC						
PDB	0,003	0,31754875	0,00317549	0,021	1,00802E-06	3,20097E-08
PDB TB	0,008	0,45682451	0,00456825	0,015	5,005E-07	2,28641E-08
MYA	0,01	0,51253482	0,00512535	0,017	5,05577E-07	2,59126E-08
MYA TB	0,053	1,71030641	0,01710306	0,006	5,34736E-08	9,14562E-09
YPD	0,271	7,78272981	0,0778273	0,074	1,44931E-07	1,12796E-07
YPD TB	0,122	3,63231198	0,03632312	0,03	1,25893E-07	4,57281E-08
YPL	0,278	7,97771588	0,07977716	0,082	1,56674E-07	1,2499E-07
YPL TB	0	0,23398329	0,00233983	0,138	8,98993E-06	2,10349E-07

b) MEDIDA DEL CRECIMIENTO DE LA CEPA ESTÁNDAR EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO.

Se mide la evolución del crecimiento de la cepa estándar CALB de la CECT, a través de las medidas de absorbancia a 600 nm, cada 24 h.

Tabla 3.35. Evolución del crecimiento de la cepa estándar de *C.antarctica* de la CECT, a través de las medidas de absorbancia a 600 nm, cada 24 h.

	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
PDB	0	0,09	0,05	0,04	0,09
PDB TB	0	0,053	0	2,66	0,546
MYA	0		0,9	0,25	0,04
MYA TB	0		2,06	0,068	0,121
YPD	0	5,63	4,62	7,22	6,6
YPD TB	0	0,59	0,258	0,139	0,172
YPL	0	5,29	2,13	5,27	11,29
YPL TB	0	1,81	1,381	1,402	1,446

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tras evaluar los resultados obtenidos se concluye que los medios más apropiados son YPD e YPL (con y sin tributirina) y que el tiempo óptimo de cultivo es de 72 h.

c) RENDIMIENTO DE LOS EXTRACTOS ENZIMÁTICOS APLICADOS COMO BIOCATALIZADOR EN LA REACCIÓN DE TRANSESTERIFICACIÓN.

Una vez obtenidos los extractos en los medios óptimos (YPD e YPL), con y sin tributirina, y con el tiempo de crecimiento determinado como más apropiado (72 h), según se detalla en el **apartado 2.1.2. y 2.2.3** (Escobar-Nino et al., 2014; Sanchez, 2012), se procede a su testado como biocatalizador en la reacción de transesterificación selectiva de aceite de girasol con etanol, para obtener el biocombustible Ecodiésel (FAEE + MG).

Tras aplicar las condiciones estándar de reacción, comprobadas con otros sistemas enzimáticos, (6 ml aceite, 1.75 ml EtOH, 30°C, 25 µL NaOH 10 N, agitación mayor de 300 rpm, durante 24 h de reacción) (C. Luna, Verdugo, et al., 2014a; C. Luna, Verdugo, et al., 2014c; Cristobal Verdugo et al., 2011), se obtienen los resultados, recogidos en la **Tabla 3.36**.

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tabla 3.36. Rendimiento de la reacción de transesterificación selectiva operando bajo las condiciones de reacción estándar: 6 ml aceite, 1.75 ml EtOH, 30°C, 25 µL NaOH 10 N, agitación mayor de 300 rpm, durante 24 h. Como biocatalizador se aplica 0.5 g de extracto enzimático de una cepa estándar de CALB adquirida en la CECT, obtenido a partir de un cultivo líquido en diferentes medios de cultivo.

Reacción	Muestra	Visc 40 °C (cSt)	Sel (%)	Conv (%)
Materia Prima	ACEITE DE GIRASOL	34.53	3.45	33.32
Blanco	BLANCO⁰	13.42	16.24	28.82
	BLANCO-YPD¹	14.60	26.93	28.96
	BLANCO-YPD²	12.33	33.12	34.48
1	YPD	9.91	76.86	82.88
	YPD-TB	11.62	63.12	76.92
	YPL	11.64	61.12	72.58
	YPL-TB	12.44	42.11	44.74
2	YPD	10.81	72.10	73.52
	YPD-TB	11.93	66.98	71.77
	YPL	11.10	60.57	69.24
	YPL-TB	12.74	45.28	52.74

Blanco⁰: Reacción sin biocatalizador

Blanco-YPD^{1/2}: Se aplica como biocatalizador un extracto obtenido de un medio de cultivo YPD sin inóculo ni crecimiento de la cepa.

La evolución del rendimiento obtenido a lo largo del tiempo de reacción se recoge en la **Tabla 3.37**.

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

d) ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DEL SISTEMA ENZIMÁTICO EN REACCIONES SUCESIVAS.

Aplicando idénticas condiciones experimentales a las mostradas en la **Tabla 3.36 y 3.37**, se realizan una serie de reacciones sucesivas con el mismo sistema biocatalítico, empleando 0.5 g de extracto enzimático de la cepa estándar de CALB adquirida en la CECT, obtenido a partir de un cultivo líquido en diferentes medios de cultivo. De esta forma se evalúa su estabilidad y vigorosidad. En esta serie de reacciones sucesivas el tiempo de reacción se reduce a 6 h, dado que es el tiempo donde se alcanzan los niveles óptimos de rendimiento. Los resultados son recogidos en la **Tabla 3.38**.

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tabla 3.37. Evolución del rendimiento de la reacción de transesterificación selectiva obtenida a lo largo del tiempo de reacción, operando bajo las condiciones de reacción estándar: 6 ml aceite, 1.75 ml EtOH, 30°C, 25 µL NaOH 10 N, agitación mayor de 300 rpm, durante 24 h. Como biocatalizador se aplica 0.5 g de extracto enzimático de una cepa estándar de CALB adquirida en la CECT, obtenido a partir de un cultivo líquido en diferentes medios de cultivo.

	YPD	YPD-TB	YPL	YPL-TB
Yield(%)	Conv	Conv	Conv	Conv
1 h	100	33,58	78,57	67,45
2 h	48,65	44,19	54,50	41,25
3 h	36,32	37,31	32,70	50,04
4 h	44,72	36,37	42,65	38,74
5 h	44,21	79,78	85,30	41,25
6 h	85,26	100	100	97,51
7 h	86,31	78,19	100	66,42
8 h	100	89,96	99,26	100
24 h	100	74,92	84,67	100
Viscosidad	2.31	11.31	8.80	8.16

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tabla 3.38. Rendimiento de la reacción de transesterificación selectiva en sucesivas reutilizaciones del mismo sistema biocatalítico, bajo condiciones de reacción estándares: 6 ml aceite, 1.75 ml EtOH, 30°C, 25 µL NaOH 10 N, agitación mayor de 300 rpm, durante 6 h. Como biocatalizador se aplica 0.5 g de extracto enzimático de una cepa estándar de CALB adquirida en la CECT, obtenido a partir de un cultivo líquido en diferentes medios de cultivo.

	Visc 40 °C (cSt)	Conv (%)
ACEITE DE GIRASOL	34.53	33.3
BLANCO ⁰	13.42	28.8
BLANCO-YPD ¹	14.60	27,86
BLANCO-YPD ²	12.33	34,48
1ª Reacción:		
YPD	2.31	100
YPD-TB	11.31	74.92
YPL	8.80	84.67
YPL-TB	8.16	100
2º Reuso:		
YPD	10.28	83.76
YPD-TB	10.67	65.80
YPL	10.43	80.12
YPL-TB	10.02	78.91
3º Reuso:		
YPD	10.55	56.13
YPD-TB	10.79	57.09
YPL	10.59	52.19
YPL-TB	10.99	56.11
4º Reuso:		
YPD	12.46	41.72
YPD-TB	10.87	36.15
YPL	11.93	47.53
YPL-TB	10.99	58.55
5º Reuso:		
YPD	12.24	34.04
YPD-TB	14.12	28.93
YPL	15.18	39.46
YPL-TB	12.09	23.42
6º Reuso:		
YPD	12.05	25.37
YPD-TB	14.60	25.81
YPL	11.84	29.42
YPL-TB	11.52	39.16
7º Reuso:		
YPD	13.55	39.67
YPD-TB	11.68	34.72
YPL	13.14	32.15
YPL-TB	10.83	50.31
8º Reuso:		
YPD	13,55	39,14
YPD-TB	12,38	37,87
YPL	12,17	28,65
YPL-TB	12,49	47,02

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tabla 3.38 (continuación).

9º Reuso:		
YPD	13.15	59.47
YPD-TB	12.34	36.14
YPL	12.29	45.48
YPL-TB	12.42	54.62
10º Reuso:		
YPD	11.12	51.86
YPD-TB	14.00	44.72
YPL	11.56	34.88
YPL-TB	12.29	50.42

3.3. CEPAS MICROBIANAS SILVESTRES.

La búsqueda, evaluación y selección de cepas microbianas silvestres recogidas en ambientes lipófilos (aceites vegetales y grasas animales), a partir de las cuales se obtienen extractos enzimáticos lipásicos (1,3-selectivos), capaces de realizar reacciones de transesterificación útiles en la síntesis de biocombustible de segunda generación, sigue el procedimiento descrito en trabajos anteriores para la recogida de muestras, aislamiento de microorganismos con actividad lipolítica y, de entre estos, aquellos que muestran actividad respecto a la reacción de transesterificación, como se muestra en la **Figura 2.15** (Escobar-Nino et al., 2014; Mellado, Escobar, Canovas, & Luna, 2013; Sanchez, 2012).

Las reacciones de etanolisis enzimáticas, para la caracterización de las cepas recogidas y seleccionadas en los "screenings" primario y secundario, se realizan mediante la metodología descrita previamente en el **apartado 2.1.2.** y en publicaciones de nuestro grupo, en las que se realiza directamente la etanolisis enzimática de aceite de girasol, analizando el rendimiento de la misma mediante Cromatografía de Gases, según la metodología explicada en el **apartado 2.1.3** (C. Luna et al., 2013; C. Luna, Verdugo, et al., 2014a, 2014b; C. Luna, Verdugo, et al., 2014c; D. Luna et al., 2012; Cristobal Verdugo et al., 2011).

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

3.3.1. CEPAS MICROBIANAS SILVESTRES RECOLECTADAS EN AMBIENTES LIPÓFILOS DE ACEITES VEGETALES.

a) SCREENING PRIMARIO Y SECUNDARIO.

Los resultados obtenidos tras la realización del "screening" primario en las muestras procedentes de las balsas de aceite vegetal durante la primera etapa de selección, 1.016 colonias (hongos, levaduras y bacterias) eran identificadas como positivas (al producir una zona de halo de hidrólisis) las muestras recogidas en la **Tabla 3.39**. De entre éstas, se seleccionaron 291 bacterias para estudios posteriores, estas cepas se inocularon primero en un medio no selectivo y se volvió a comprobar la actividad lipolítica sobre un medio LB + tributirina, confirmándose su actividad hidrolítica. Estas muestras son las que se sometieron posteriormente al screening secundario.

Tabla 3.39. Distribución de los tipos de microorganismos lipolíticos aislados de las muestras procedentes de las balsas de aceite de oliva.

Muestra	Bacterias	Levaduras	Hongos	Total
AE1B	61	21	174	256
AE2B	136	208	10	392
AEDH	57	190	1	248
AEA	7	70	51	128
Total	291	489	236	1016

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

La confirmación de la actividad transesterificadora en el "screening" secundario de las cepas seleccionadas se realizó mediante el método colorimétrico en medio líquido, según el procedimiento anteriormente descrito (Escobar-Nino et al., 2014; Sanchez, 2012; Teng & Xu, 2007) obteniéndose los resultados indicados en la **Tabla 3.40** para las muestras procedentes de las balsas de aceite vegetal.

Tabla 3.40. Clasificación, según su absorbancia, de cepas procedentes del aceite vegetal que muestran actividad transesterificadora del p-nitrofenolpalmitato.

Absorbancia 410 nm	Nº cepas	Positivo/Negativo
> 1	30	Positivo
1 – 0.8	28	Positivo
< 0.8	233	Negativo

b) SELECCIÓN DE CEPAS SILVESTRES.

Con respecto a la evaluación y selección de las lipasas silvestres recolectadas en ambientes lipófilos (aceites vegetales), eficaces en la reacción de etanolisis para producir Ecodiésel, una vez obtenidos los extractos de las cepas seleccionadas en los anteriores procesos de screening, mediante liofilización con diálisis previa, se someten a dicha reacción de alcoholisis, en las condiciones experimentales indicadas en el **apartado 2.1.2** procediendo a la caracterización del biocombustible obtenido en cada caso (**apartado 2.1.3**), analizando su composición por Cromatografía de Gases y determinando su Viscosidad cinemática.

Al estudiar la eficacia biocatalítica de estos extractos procedentes de aceite vegetal, obtenidos mediante liofilización, sin aplicar diálisis previa, se obtienen

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

resultados inesperados y peores de los previstos, ya que se obtiene un escaso rendimiento como se comprueba en la **Tabla 3.41**.

Tras someter a algunos de estos extractos de la misma cepa a un proceso de diálisis previa se puede comprobar cómo aumenta el rendimiento de la reacción de transesterificación. Tenemos por tanto que se puede concluir el carácter fundamental del proceso de filtración y preconcentrado del extracto (diálisis), en la obtención de biocatalizadores eficaces, como se puede comprobar en la **Tabla 3.42**.

Es decir, para la obtención del material enzimático de microorganismos cultivados sin purificar, pero capaces de realizar el proceso de alcoholisis, es esencial la realización de un proceso de diálisis previa. Esta metodología simple permite acceder a un material enzimático de forma muy económica, si se le compara con el material purificado único actualmente disponible comercialmente, capaz de cumplir las exigencias mínimas requeridas para obtener un proceso de alcoholisis enzimática, simple y de bajo costo.

En base a estos resultados, se procede a repetir la obtención de los extractos de aquellas cepas con mejores resultados previos, pero aplicándole el proceso adicional de diálisis previa, comprobándose en todos los casos la mejora del rendimiento notablemente. Los resultados de todas las cepas ensayadas, cuyos extractos han sido obtenidos mediante liofilización y diálisis previa, son recogidos en la **Tabla 3.43**.

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tabla 3.41. Viscosidad, conversión y selectividad obtenidas en la transesterificación enzimática selectiva de aceite de girasol, empleando 38 extractos bacterianos, 42 extractos de levaduras y 1 extracto fúngico, procedentes del aceite vegetal, liofilizados, sin diálisis previa. Condiciones de reacción, 37 °C, 24 horas, 300 rpm, operando con 6 ml de aceite, 1.75 ml etanol absoluto y 0.0125 ml de disolución acuosa de NaOH 10N.

(a) Balsa 1 y Deshidratado de Hojas:

Muestra	Micro-organismo	Viscosidad (cSt)	Sel (%)	DG (%)	TG (%)	Conv (%)	Sel (%)
Girasol		34.5	3.4	29.9	66.7	33.3	3.4
Patrón		13.42	16.2	10.6	71.2	28.8	13.8
Balsa 1							
1B20	Bacteria	19.7	6.8	1.98	91.2	8.8	6.82
1B21	Bacteria	18.8	5.9	32.8	61.3	38.7	5.9
1B21₍₂₎		18.7	7.9	0.06	92.0	7.9	7.9
1B22	Bacteria	14.3	11.6	42.6	45.9	54.1	11.6
1B22₍₂₎		21.6	6.5	6.39	87.0	12.94	6.55
1B26	Bacteria	19.1	11.8	29.9	58.2	41.7	11.8
1B26₍₂₎		19.8	55.2	17.7	27.0	72.9	55.2
1B27	Bacteria	15.0	12.5	17.4	70.1	29.9	12.5
1B27₍₂₎		20.7	4.4	95.6	0	100	4.4
1B28	Bacteria	15.9	7.9	32.0	60.2	39.8	7.9
1B28₍₂₎		19.7	9.2	7.6	83.1	16.9	9.24
1B35	Bacteria	16.2	24.7	35.0	40.3	59.7	24.7
1B35₍₂₎		20.4	68.2	2.00	29.8	70.2	68.2
1B50	Levadura	14,8	14.1	34.3	51.6	48.4	14.1
1B59	Levadura	12.4	20.5	41.5	38.0	62.0	20.5
1B89	Bacteria	19.0	42.2	20.2	20.2	37.7	42.2
1B89₍₂₎		21.7	11.3	28.1	60.5	39.5	11.3
1B 90	Bacteria	16.4	15.2	23.4	61.4	15.2	15.2
1B90₍₂₎		20.4	9.9	1.58	88.44	11.5	9.9
1B92	Bacteria	16.9	22.7	38.6	38.7	61.3	22.7
1B92₍₂₎		19.3	20.6	1.9	77.4	22.6	20.6
1B68H	Hongo	10.9	64.6	13.6	21.8	78.2	64.6

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tabla 3.41.a (continuación)

Muestra	Microorg.	Viscosidad (cSt)	Sel. (%)	DG (%)	TG (%)	Conv. (%)	Sel. (%)
Deshidratado de Hojas							
DH145	Bacteria	16.4	15.1	2.3	82.6	17.3	15.1
DH201	Levadura	22.3	4.8	21.5	73.7	26.3	4.8
DH206	Levadura	18.9	34.9	39.6	25.5	74.5	34.9
DH220	Levadura	20.4	52.4	21.1	26.5	73.5	52.4
DH277	Levadura	26.1	4.7	89.8	5.5	94.5	4.7

(b.1) Balsa 2:

Muestra	Microorg.	Viscosidad (cSt)	Sel. (%)	DG (%)	TG (%)	Conv. (%)	Sel. (%)
Girasol		34.5	3.4	29.9	66.7	33.3	3.4
Patrón		13.42	16.2	10.6	71.2	28.8	13.8
2B3	Levadura	14.62	11.7	5.5	82.7	17.3	11.7
2B4	Levadura	14.29	8.5	5.5	86.0	14.0	8.5
2B5	Levadura	14.56	5.2	12.6	82.2	17.8	5.2
2B6	Levadura	10.97	9.8	8.6	81.6	18.4	9.8
2B7	Levadura	11.67	51.2	13.3	35.5	64.5	51.2
2B8	Levadura	13.44	5.0	28.9	66.1	33.9	5.0
2B9	Levadura	11.83	25.2	30.6	55.8	44.2	25.2
2B10	Levadura	11.73	82.4	5.1	12.5	87.5	82.4
2B14	Levadura	13.60	17.0	29.2	53.7	46.3	17.0
2B15	Levadura	12.41	45.8	48.0	6.2	93.8	45.8
2B21	Levadura	12.05	26.3	25.9	47.8	52.2	26.3
2B22	Levadura	12.74	19.1	65.0	15.9	84.1	19.1
2B23	Levadura	12.5	24.5	20.7	54.8	45.2	24.5
2B24	Levadura	18.99	14.5	18.6	68.9	33.1	14.5
2B26	Levadura	18.87	1.2	23.6	75.2	24.8	1.2
2B27	Levadura	20.85	14.0	86.0	0	100	14.0
2B29	Bacteria	16.07	5.0	18.7	76.3	23.7	5.0
2B29 ₍₂₎		17.61	6.93	0.13	92.94	7.06	6.93
2B30	Levadura	17.65	3.0	28.5	68.5	31.5	3.0
2B 30 ₍₂₎		20.69	4.5	37.1	58.4	41.6	4.5
2B31	Levadura	19.27	0.9	58.7	40.4	59.6	0.9
2B32	Levadura	19.47	19.0	19.4	61.6	38.4	19.0

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

(b.2) Balsa 2:

Muestra	Microorg.	Viscosidad	Sel. (%)	DG	TG	Conv. (%)	Sel. (%)
Girasol		34.5	3.4	29.9	66.7	33.3	3.4
Patrón		13.42	16.2	10.6	71.2	28.8	13.8
2B34	Levadura	26.25	7.0	64.6	28.4	71.6	7.0
2B37	Levadura	19.68	35.7	29.8	34.5	65.5	35.7
2B38	Levadura	19.51	13.8	31.0	55.2	44.8	13.8
2B39	Levadura	19.72	19.9	50.0	30.1	69.9	19.9
2B43	Levadura	19.39	35.8	49.1	15.1	84.9	35.8
2B44	Levadura	19.55	6.7	33.8	59.5	40.5	6.7
2B45	Levadura	18.91	6.3	80.4	13.3	86.7	6.3
2B46	Levadura	18.79	4.9	24.9	70.2	29.8	4.9
2B85	Bacteria	14.8	29.6	42.7	27.7	72.3	29.6
2B85 ₍₂₎		10.2	39.2	19.5	41.3	58.7	39.2
2B85 ₍₃₎		21.59	6.41	3.37	90.21	9.79	3.37
2B120	Bacteria	12.5	34.2	20.7	45.1	54.9	34.2
2B120 ₍₂₎		10.2	17.6	27.1	55.8	44.7	17.6
2B122	Bacteria	13.3	34.2	28.8	39.0	61.0	34.2
2B122 ₍₂₎		9.2	71.3	27.6	1.1	98.9	71.3
2B122 ₍₃₎		21.22	5.80	17.2	77.02	22.98	5.8
2B128	Levadura	14.3	14.9	25.6	59.5	40.5	14.9
2B129	Levadura	18.1	30.2	61.3	8.5	91.5	30.2
2B130	Bacteria	18.4	0.6	36.2	63.2	36.8	0.6
2B130 ₍₂₎		19.43	18.8	13.5	32.3	67.7	18.8
2B131	Bacteria	16.7	8.92	30.44	60.70	39.36	8.9
2B131 ₍₂₎		16.8	23.36	4.25	72.39	27.61	23.36
2B132	Levadura	16.4	11.0	54.1	34.9	65.1	11.0
2B133	Bacteria	16.3	9.80	41.62	48.6	51.4	9.8
2B133 ₍₂₎		19.7	4.42	4.39	91.22	8.82	4.42
2B134	Bacteria	14.3	6.80	34.42	58.78	41.22	6.8
2B134 ₍₂₎		27.9	12.0	9.0	79.0	21.0	12.0
2B199	Bacteria	19.88	12.2	43.3	44.5	55.5	12.1
2B199 ₍₂₎		23.82	7.89	0.15	91.96	8.04	7.89
2B220	Bacteria	15.62	40.2	59.8	0.0	100	40.2
2B220 ₍₂₎		17.98	19.41	15.45	65.13	34.87	19.41
2B222	Bacteria	19.07	10.4	0.5	89.1	10.9	10.4
2B222 ₍₂₎		19.40	4.95	95.04	0	100	4.95

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

(b.3) Balsa 2:

Muestra	Microorg.	Viscosidad	Sel. (%)	DG	TG	Conv. (%)	Sel. (%)
Girasol		34.5	3.4	29.9	66.7	33.3	3.4
Patrón		13.42	16.2	10.6	71.2	28.8	13.8
2B225	Levadura	20.70	16.3	32.6	51.1	48.9	16.3
2B226	Bacteria	17.73	4.68	0.07	95.25	4.75	4.68
2B226₍₂₎		18.24	2.9	78.3	18.8	81.2	2.9
2B227₍₂₎	Bacteria	20.25	10.16	6.76	85.08	16.92	10.16
2B228	Bacteria	17.69	12.5	87.5	0.0	100	12.5
2B228₍₂₎		16.71	16.55	0.79	82.64	17.35	16.56
2B230	Bacteria	18.09	7.55	9.86	82.59	17.42	7.55
2B230₍₂₎		18.99	5.75	0.33	94.02	5.98	5.75
2B231	Levadura	24.63	15.9	84.1	0	100	14.0
2B232	Bacteria	17.20	15.00	0.1	84.9	15.1	15
2B232₍₂₎		18.40	7.4	7.4	85.2	14.8	7.4
2B234	Levadura	19.88	3.5	51.7	44.8	55.2	3.5
2B242	Bacteria	16.99	13.2	36.2	50.6	49.2	13.2
2B242₍₂₎	Bacteria	19.72	8.26	0.46	91.27	8.73	8.26
2B250		26.7	7.6	19.7	72.7	27.3	7.6
2B250₍₂₎		23.171	7.88	4.26	87.85	12.15	7.88
2B259	Bacteria	11.93	6.6	10.9	82.5	17.5	6.6
2B259₍₂₎		18.99	6.30	1.22	92.16	7.53	6.30
2B261	Bacteria	23.00	3.6	21.8	74.5	25.5	3.6
2B261₍₂₎		18.58	8.00	6.0	86.0	14	8.0
2B263	Bacteria	20.29	10.1	51.6	38.3	61.7	10.1
2B263₍₂₎		18.62	11.19	1.05	87.75	12.25	11.19
2B264	Bacteria	22.52	2.2	13.8	84.0	16.0	2.2
2B264₍₂₎		18.42	8.67	1.47	89.85	10.15	8.67
2B332	Bacteria	18.78	12.82	1.18	86	14	12.82
2B332₍₂₎		23.77	17.34	14.53	68.11	31.88	17.34
2B340	Bacteria	18.22	1.2	32.5	66.3	33.7	1.2
2B340₍₂₎		20.00	13.9	13.8	72.3	27.7	13.9
2B341	Bacteria	11.67	33.3	20.1	46.6	53.4	33.3
2B341₍₂₎		20.29	12.41	12.11	75.48	24.52	12.41
2B342	Bacteria	16.55	40.2	27.1	32.7	67.3	40.2
2B342₍₂₎		18.09	16.56	19.44	64	36	16.56
2B399	Levadura	14.24	16.9	17.4	65.7	34.3	16.9

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tabla 3.42. Rendimiento obtenido en la reacción de transesterificación enzimática de aceite de girasol, para la obtención de Ecodiésel, empleando los mismos extractos bacterianos liofilizados, con o sin diálisis previa, operando en las condiciones estándar estudiadas: 37 °C, 24 horas, 300 rpm, operando con 6 ml de aceite, 1.75 ml etanol absoluto y 0.0125 ml de disolución acuosa de NaOH 10N.

Muestra	Viscosidad 40 °C, (cSt)	FAE (%)	DG (%)	TG (%)	Conv. (%)	Sel. (%)
girasol	34.5	3.4	29.9	66.7	33.3	3.4
patrón	13.42	16.2	10.6	71.2	28.8	13.8
1B 89	21.71	11.30	28.15	39.46	60.53	11.30
1B 89D	13.95	32.68	2.0	68.31	34.68	32.68
1B92	19.35	20.62	1.97	77.41	22.59	20.62
1B 92 D	13.79	67.19	5.50	27.30	72.69	67.19
2B122	21.22	5.80	17.2	77.02	22.98	5.8
2B 122D	15.26	96.5	3.5	0	100	96.5
2B 342	18.09	16.56	19.44	64.0	36.0	16.56
2B 342D	14.09	59.05	40.99	0	100	59.05
1B68H	10.92	64.6	13.6	21.8	78.2	64.6
1B H 68D	17.81	36.66	12.71	50.62	49.38	36.6

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tabla 3.43. Viscosidad, composición, conversión y selectividad obtenidas en la transesterificación enzimática de aceite de girasol, empleando 30 extractos bacterianos procedentes de aceite vegetal, liofilizados, con diálisis previa. Condiciones de reacción, 37 °C, 24 horas, 300 rpm, operando con 6 ml de aceite, 1.75 ml etanol absoluto y 0.0125 ml de disolución acuosa de NaOH 10N.

Muestra	Viscosidad (cSt)	FAEE (%)	DG (%)	TG (%)	Conv (%)	Sel (%)
Girasol	34.5	3.4	29.9	66.7	33.3	3.4
Patrón	13.42	16.2	10.6	71.2	28.8	13.8
(Balsa 2)						
AE2B 29	12.4	76.0	7.8	16.2	83.8	76.0
AE2B 30	10.8	66.8	5.1	28.1	71.9	66.8
AE2B 85	12.1	41.2	13.8	45.1	54.9	41.2
AE2B 120	11.1	35.1	15.1	50.1	50.2	35.1
AE2B 122	13.2	87.6	1.8	10.7	89.3	87.6
AE2B 130	13.7	71.8	8.1	20.1	79.9	71.8
AE2B 131	13.2	41.5	5.0	53.4	46.6	41.5
AE2B 133	15.7	34.8	19.5	45.7	54.3	34.8
AE2B 134	14.4	31.7	2.1	66.3	33.7	31.7
AE2B 199	13.5	25.0	3.3	71.7	28.3	25,0
AE2B 222	11.7	77.5	3.2	12.9	87.1	77.5
AE2B 232	11.9	48.1	0.7	51.2	48.8	48.1
AE2B 259	17.9	30.7	8.3	61.0	39.0	30.7
AE2B 261	11.2	82.6	7.8	9.6	90.4	82.6
AE2B 264	16.8	24.1	2.6	73.3	26.7	24.1
AE2B 332	12.0	54.0	0.7	45.4	54.7	54.0
AE2B 340	12.4	51.4	1.0	47.6	52.4	51.4
AE2B 250	17.2	46.4	10.7	42.9	57.1	46.4
AE2B 263	12.2	49.3	10.5	40.2	59.8	49.3
(Balsa 1)						
AE1B 20	11.7	63.1	6.7	30.2	69.8	63.1
AE1B 21	11.8	93.7	6.3	0.0	100.0	93.7
AE1B 22	10.9	65.9	2.5	31.7	68.4	65.9
AE1B 26	10.8	80.1	12.9	7.1	92.9	80.1
AE1B 27	11.7	57.9	4.3	37.7	62.3	57.9
AE1B 28	11.4	58.7	3.1	38.2	61.8	58.7
AE1B 35	11.3	67.4	2.5	30.2	69.8	67.4
AE1B 89	15.0	72.2	11.6	16.2	83.8	72.2
AE1B 90	11.2	58.6	2.7	38.7	61.3	58.6
AE1B 92	11.7	80.1	7.5	12.4	87.6	80.1
(Deshidratado Hojas)						
AEDH 145	11.0	61.0	4.0	35.0	65.0	61.0

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

c) ESTUDIO DEL RENDIMIENTO DE LAS CEPAS MÁS EFICACES.

Para optimizar el proceso de selección de las cepas silvestres investigadas más eficientes (1B89, 2B122, 2B342, 1BH68, 1B92, 2B220, 2B222), se estudia la evolución del rendimiento a lo largo del tiempo de reacción y varios ciclos de reacción con el sistema biocatalítico obtenido con las cepas más eficaces. Los resultados obtenidos se recogen en las siguientes Tablas (**Tabla 3.44 a Tabla 3.49**).

Tabla 3.44. Rendimiento del extracto lipásico 1B89, operando en las condiciones de reacción estándar en sucesivos ciclos de reusos. (37 °C, 24 horas, 300 rpm, 6 ml de aceite, 1.75 ml etanol absoluto y 0.0125 ml de disolución acuosa de NaOH 10N).

Muestra	Viscosidad (cSt)	FAEE (%)	DG (%)	TG (%)	Conversión (%)	Selectividad (%)
Girasol	34.5	3.4	29.9	66.7	33.3	3.4
Patrón	13.42	16.2	10.6	71.2	28.8	13.8
1B 89	16.03	79.1	20.9	0	100	79.1
1B 89 (II)	21.10	58.64	41.36	0	100	58.64
1B 89 (III)	15.87	75.8	17.91	8.24	91.75	73.83
1B89 (IV)	14.28	54.71	4.48	40.80	59.20	54.71
1B89 (V)	13.07	43.58	1.11	55.30	44.70	43.58
1B89 (VI)	18.58	94.94	5.05	0	100	94.94
1B89 (VII)	15.82	77.53	4.05	18.42	81.58	77.53
1B89 (VIII)	17.65	93.51	6.49	0	100	93.51
1B89 (IX)	15.91	59.49	1.85	38.66	61.34	59.49
1B89 (X)	17.36	43.30	2.62	54.08	45.92	43.30

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tabla 3.45. Rendimiento del extracto lipásico 2B 122, operando en las condiciones de reacción estándar en sucesivos ciclos de reusos. (37 °C, 24 horas, 300 rpm, 6 ml de aceite, 1.75 ml etanol absoluto y 0.0125 ml de disolución acuosa de NaOH 10N).

Muestra	Viscosidad (cSt)	FAEE (%)	DG (%)	TG (%)	Conversión (%)	Selectividad (%)
Girasol	34.5	3.4	29.9	66.7	33.3	3.4
Patrón	13.42	16.2	10.6	71.2	28.8	13.8
2B 122	15.26	96.5	3.5	0	100	96.5
2B 122 (II)	19.23	67.77	32.22	0	100	67.77
2B 122 (III)	13.56	39.16	0.65	60.29	39.81	39.16
2B 122 (IV)	12.98	43.90	3.5	52.6	47.4	43.90
2B 122 (V)	12.5	45.70	9.52	44.76	55.23	45.70
2B 122 (VI)	13.72	40.39	59.61	0	100	40.39
2B 122 (VII)	15.14	64.31	4.08	31.61	68.39	64.31
2B122 (VIII)	15.12	60.44	37.86	1.68	98.31	60.44
2B 122 (IX)	12.09	46.06	1.12	52.82	47.18	46.06
2B 122 (X)	13.06	54.13	0.55	45.32	54.68	54.13

Tabla 3.46. Rendimiento del extracto lipásico 2B342, operando en las condiciones de reacción estándar en sucesivos ciclos de reusos. (37 °C, 24 horas, 300 rpm, 6 ml de aceite, 1.75 ml etanol absoluto y 0.0125 ml de disolución acuosa de NaOH 10N).

Muestra	Viscosidad (cSt)	FAEE (%)	DG (%)	TG (%)	Conversión (%)	Selectividad (%)
Girasol	34.5	3.4	29.9	66.7	33.3	3.4
Patrón	13.42	16.2	10.6	71.2	28.8	13.8
2B 342	14.09	59.05	40.99	0	100	59.05
2B 342 (II)	15.83	55.29	16.6	28	72	55.29
2B 342 (III)	17.85	35.08	3.61	61.3	38.7	35.08
2B 342 (IV)	14.64	29.07	1.73	60.2	30.8	29.07
2B 342 (V)	14.04	31.21	68.89	0	100	31.21
2B 342 (VI)	15.95	19.88	80.12	0	100	19.88
2B 342 (VII)	15.94	55.81	1.14	43.05	56.95	55.81
2B 342 (VIII)	11.36	42.38	0.92	56.69	43.31	42.38
2B 342 (IX)	13.02	44.76	0.52	54.72	45.28	44.76
2B 342 (X)	12.98	40.17	0.88	58.94	41.05	40.17

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tabla 3.47. Rendimiento del extracto lipasídico 1BH68 (en su 2º ciclo de reacción cada 60 min.) en las condiciones de reacción estándar en sucesivos ciclos de reusos (37 °C, 24 horas, 300 rpm, operando con 6 ml de aceite, 1.75 ml etanol absoluto y 0.0125 ml de disolución acuosa de NaOH 10N).

Muestra	Viscosidad (cSt)	FAEE (%)	DG (%)	TG (%)	Conversión (%)	Selectividad (%)
Girasol	34.5	3.4	29.9	66.7	33.3	3.4
Patrón	13.42	16.2	10.6	71.2	28.8	13.8
1BH68	17.81	36.66	12.71	50.62	49.38	36.6
1BH68 (II)						
1º h	-----	25.29	11.23	63.48	36.52	25.29
2º h	-----	34.61	4.08	61.31	38.69	34.61
3º h	-----	35.5	8.97	55.52	44.48	35.5
4º h	-----	34.72	3.91	61.36	38.63	34.72
5º h	-----	33.11	3.30	63.58	36.41	33.11
6º h	-----	45.01	4.48	50.5	49.5	45.01
7º h	-----	29.58	22.48	47.94	52.06	29.58
.....						
24 h	13.91	35.23	18.70	46.05	53.94	35.23
1BH68 (III)	13.70	46.25	1.58	52.16	47.84	46.25
1BH68 (IV)	10.91	56.21	0.94	42.85	57.15	56.21
1BH68 (V)	12.86	66.27	1.05	32.67	67.33	66.27
1BH68 (VI)	12.29	70.14	2.00	27.86	72.14	70.14
1BH68 (VII)	10.87	51.74	5.88	42.38	57.62	51.74
1BH68 (VIII)	11.52	96.68	3.32	0	100	96.68
1BH68 (IX)	11.60	90.17	4.67	5.16	94.84	90.17

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tabla 3.48. Rendimiento del extracto lipásico 1B92 (cada 60 min.) operando en las condiciones de reacción estándar en sucesivos ciclos de reusos (37 °C, 24 horas, 300 rpm, operando con 6 ml de aceite, 1.75 ml etanol absoluto y 0.0125 ml de disolución acuosa de NaOH 10N).

Muestra	Viscosidad (cSt)	FAEE (%)	DG (%)	TG (%)	Conversión (%)	Selectividad (%)
Girasol	34.5	3.4	29.9	66.7	33.3	3.4
Patrón	13.42	16.2	10.6	71.2	28.8	13.8
1B 92	13.79					
1h		68.97	1.33	29.70	70.30	68.97
2h		62.74	2.92	34.34	65.66	62.74
24h		67.19	5.50	27.30	72.69	67.19
1B 92 (II)	15.54					
1 h		66.48	1.17	32.33	67.66	66.48
2 h		55.18	2.77	42.04	57.96	55.18
3 h		83.17	15.61	1.21	98.78	83.17
.....						
24 h		91.4	8.6	0	100	91.4
1B 92 (III)	15.14					
1 h		91.36	8.64	0	100	91.36
2 h		91.22	8.79	0	100	91.21
3 h		90.49	9.51	0	100	90.49
4h		90.31	9.69	0	100	90.31
5h		92.10	7.90	0	100	92.10
6h		87.94	12.06	0	100	87.94
7h		88.19	11.81	0	100	88.19
8h		90.39	9.61	0	100	90.39
.....						
24 h		91.89	8.11	0	100	91.89
1B 92 (IV)	12.34	94.15	5.85	0	100	94.15
1B 92 (V)	12.98	63.59	0	36.41	63.59	63.59
1B 92 (VI)	12.05	100	0	0	100	100

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tabla 3.49. Rendimiento del extracto lipásico 2B220 operando (cada 60 min.) en las condiciones de reacción estándar en sucesivos ciclos de reusos (37 °C, 24 horas, 300 rpm, operando con 6 ml de aceite, 1.75 ml etanol absoluto y 0.0125 ml de disolución acuosa de NaOH 10N).

Muestra	Viscosidad (cSt)	FAEE (%)	DG (%)	TG (%)	Conversión (%)	Selectividad (%)
Girasol	34.5	3.4	29.9	66.7	33.3	3.4
Patrón	13.42	16.2	10.6	71.2	28.8	13.8
2B 220	11.56					
1h		60.73	0	39.27	60.73	60.73
2h		72.82	0	27.18	72.82	72.82
3h		96.72	0	3.28	96.72	96.72
....						
24h		68.03	9.94	22.03	77.97	68.03
2B 220 (II)	13.63					
1h		96.21	3.79	0	100	96.21
2h		93.30	6.70	0	100	93.30
3h		100	0	0	100	100
4h		99.93	0.07	0	100	99.93
5h		99.87	0.13	0	100	99.87
6h		100	0	0	100	100
7h		98.86	1.14	0	100	98.86
8h		100	0	0	100	100
....						
24 h		100	0	0	100	100
2B 222 (III)	11.52	100	0	0	100	100
2B 222 (IV)	11.32	100	0	0	100	100
2B 222 (V)	11.69	67.18	0	32.82	67.18	67.18

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

d) CARACTERIZACIÓN FILOGENÉTICA DE LAS CEPAS MÁS EFICACES Y ESTUDIO MÁS EXHAUSTIVO DE LA CEPA AE122 PARA OPTIMIZAR SU PRODUCCIÓN

Mediante reacciones de transesterificación de aceite de girasol se han identificado las 5 cepas bacterianas, procedentes de ambientes lipófilos ricos en aceites vegetales, con valores de selectividad de más de 80%. De entre estas, las dos cepas con mayores rendimientos pertenecen al género *Terribacillus* (AE2B122, AE1B21) (**Tabla 3.43**) (Mellado et al., 2013). Las lipasas pertenecientes a este género no habían sido caracterizadas hasta ahora como catalizadores enzimáticos en la producción de biocombustibles.

Por lo tanto, este procedimiento ha permitido identificar nuevos géneros útiles en esta área. Así, estas cepas pudieran ser de gran interés en su aplicación a escala industrial.

Tras sembrar la misma cepa (AE2B 122) en dos medios diferentes (LB y PYA), comprobamos que el microorganismo crece mejor y produce más y óptimamente su extracto enzimático en el medio LB que en el medio PYA (Y.-G. Kim et al., 2007), a pesar que en el primer medio a las 48 h de su crecimiento se lisa y muere, con lo que lógicamente hay que proceder a su extracción antes de dicho tiempo (**Tabla 3.50**). También, observamos que se produce un extracto enzimático más eficaz en caso de cultivos a concentración intermedia en población de colonias, con menor densidad óptica, como se aprecia en la **Tabla 3.51**.

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tabla 3.50. Resultados obtenidos en la transesterificación enzimática de aceite de girasol empleando un extracto liofilizado, previamente dializado, de la muestra 2B 122D, habiendo crecido en diferente medio de cultivo (medio LB vs. Medio PYA). Condiciones de operación, 37 °C, 24 horas, 300 rpm, operando con 6 ml de aceite, 1.75 ml etanol absoluto y 0.0125 ml de disolución acuosa de NaOH 10N.

Muestra	Visc 40 °C (cSt)	Sel (%)	Conv (%)
ACEITE DE GIRASOL	34.53	3.45	33.32
BLANCO ^u	13.42	16.24	28.82
LB	10.88	48.27	94.38
PYA	12.34	35.42	67.64

A fin de conseguir una mejor caracterización del material genético seleccionado, se ha efectuado el análisis filogenético basado en la técnica del ARNr 16S, de las 30 cepas bacterianas procedentes de ambientes lipófilos relacionados con aceites vegetales, productoras de biocombustibles, contrastándolo con sus actividades hidrolíticas (Escobar-Nino et al., 2014). Los resultados obtenidos se recogen en la **Tabla 3.52**.

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tabla 3.51. Resultados obtenidos en la transesterificación enzimática de aceite de girasol empleando un extracto liofilizado, previamente dializado, de la muestra 2B 122D, habiendo crecido en medio de cultivo en diferente extensión como muestra su densidad óptica. Condiciones de operación, 37 °C, 24 horas, 300 rpm, operando con 6 mL de aceite, 1.75 ml etanol absoluto y 0.0125 ml de disolución acuosa de NaOH 10N.

Muestra	Visc 40 °C (cSt)	Sel (%)	Conv (%)
ACEITE DE GIRASOL	34.53	3.45	33.32
BLANCO ⁰	13.42	16.24	28.82
0.04	11.1	61.23	72.5
0.06	9.6	72.64	85.32
0.08	11.4	56.62	61.58

La purificación de estos extractos no aporta ningún tipo ventaja cuando opera como biocatalizador en un proceso de etanolisis. Así, un proceso de purificación del extracto, obtenido a partir de esta cepa, en una columna de intercambio hidrofóbico, HiTrap HIC, de 5ml, con matriz de fenil sefarosa, mediante un sistema de FPLC, no proporciona resultados superiores a los obtenidos con las lipasas sin purificar (**Tabla 3.53**), estos resultados pueden ser debidos a la baja cantidad de proteína que queda después de la purificación.

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tabla 3.52 Análisis filogenético basado en la técnica del ARNr 16S y actividades hidrolíticas de las 30 cepas bacterianas procedentes ambientes lipófilos relacionados con aceites vegetales productoras de biocombustibles.

Sample	Closest relative	Accession numbers	% Similarity	DNase	Pullulanae	Xylanase	Amylase	Protease
AE2B 340	<i>Pseudomonas veronii</i>	AF064460	99	+			+	
AE2B 30								+
AE2B 29								+
AE2B 263								+
AE2B 264								+
AE2B 332				+			+	
AE2B 199				+			+	
AE2B 232				+			+	
AE2B 222				+			+	
AE2B 134				<i>Pseudomonas extremaustralis</i>	AJ583501	100		
AE2B 261	99							
AE2B 133								
AE2B 130								
AE2B 259	<i>Pseudomonas grimontii</i> CFML 97-514T; AF268029	AF268029	99					
AE2B 120	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	AF094748	98		+		+	
AE2B 85			99		+		+	
AEDH 145	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	X81665	99					
AE1B 89	<i>Enterobacter ludwigii</i>	AJ853891	99					
AE1B 90								
AE1B 92								
AE1B 27	<i>Aeromonas media</i> ;	X60410	99	+	+		+	+
AE1B 22			100	+	+		+	+
AE1B 20	<i>Aeromonas hydrophila</i> strain: LMG 19562;	AJ508765	99	+	+		+	+
AE2B 250	<i>Bacillus simplex</i> <i>Bacillus muralis</i>	AJ439078	99	+				
AE1B 35			99	+				

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tabla 3.52 (Continuación)

Sample	Closest relative	Accession numbers	% Similarity	DNase	Pullulanae	Xylanase	Amylase	Protease
AE1B 26	<i>Bacillus simplex</i> AJ439078	AJ439078	99		+			+
AE1B 28	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	D83363	99				+	
AE2B 131	<i>Terribacillus goriensis</i>	DQ519571	99					
AE2B 122								
AE1B 21				<i>Terribacillus saccharophilus</i>				

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tabla 3.53. Resultados obtenidos en la transesterificación enzimática de aceite de girasol empleando un extracto liofilizado, previamente dializado, sometido a un proceso de purificación de la muestra 2B 122D (*G. Terribacillus*). Condiciones de operación, 37 °C, 24 horas, 300 rpm, 6 mL de aceite, 1.75 ml etanol absoluto y 0.0125 ml de disolución acuosa de NaOH N10N.

Muestra	Visc 40 °C (cSt)	Sel (%)	Conv (%)
ACEITE DE GIRASOL	34.53	3.45	33.32
BLANCO⁰	13.42	16.24	28.82
SA	12,91	19,64	39,66
UA1	10,02	66,74	72,10
UA2	10,83	52,40	64,68
UA 3	14,97	21,02	34,04
UA4	10,96	58,51	60,57
UA 5	16,96	33,24	41,44
UA 6	13,96	31,82	37,12
UA 7	6,82	72,06	75,08

- AU1: Unificación primera zona de purificación de HIC, con actividad.
- AU2: Unificación segunda zona de purificación HIC y primera en columna de tamaño con actividad.
- AU3: Unificación segunda zona de purificación HIC y segunda en columna de tamaño con actividad.
- AU4: Unificación tercera zona de purificación HIC y primera en columna de tamaño con actividad.
- AU5: Unificación tercera zona de purificación HIC y segunda en columna de tamaño con actividad.
- AU6: Unificación cuarta zona de purificación HIC y primera en columna de tamaño con actividad.
- AU7: Unificación cuarta zona de purificación HIC y segunda en columna de tamaño con actividad.
- SA: un control de una zona sin actividad

3.3.2. CEPAS MICROBIANAS SILVESTRES RECOLECTADAS EN AMBIENTES LIPOFILOS DE GRASA ANIMAL.

a) SCREENING PRIMARIO Y SECUNDARIO.

Con el fin de determinar la presencia de microorganismos con capacidad transesterificadora, las muestras recogidas fueron sembradas en placas con distintos medios con tributirina mediante el procedimiento seguido en el correspondiente **apartado 2.2.3** de Materiales y Métodos. Se aislaron 3.103 colonias entre bacterias y levaduras y 952 hongos (**Tabla 3.54**). De este total, 75 colonias, de bacterias y levaduras fueron aisladas de restos de pescado, y a partir de la grasa del jamón se aislaron 3.028 colonias; incluyendo bacterias y levaduras y los 952 hongos. De todos estos microorganismos que crecieron en medios con tributirina, sólo los que produjeron halo alrededor de la colonia fueron considerados posibles positivos: 66 bacterias y 428 hongos. Se encontraron 63 bacterias en el caso del serrín del pescado y 3 bacterias y 428 hongos en el caso del aceite del jamón. Bacterias y hongos fueron sembrados en medios LB y PDA respectivamente, con el fin conseguir cultivos puros. Todas ellas se volvieron a sembrar en medios LB/PDA con tributirina para confirmar su actividad. De todas estas cepas, las 66 bacterias y 393 hongos, todos ellos con características morfológicas similares, produjeron un halo claro alrededor de la colonia confirmando así una actividad lipolítica (**Tabla 3.55**).

Los microorganismos lipolíticos aislados de las muestras en el ensayo en placa se muestran en la **Tabla 3.55**. De todas las cepas confirmadas, el estudio se centró en las 66 bacterias y 3 hongos escogidos al azar entre los confirmados (HR1159, HR1165 y HR1214) para continuar con el screening secundario (**Tabla 3.56**).

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tabla 3.54. Cepas aisladas en el muestreo realizado en ambientes lipófilos de grasa animal y medios de cultivo utilizados.

Tª Incubación	MUESTRAS											
	HR2-1 (Serrín de Pescado)				HR1-2 (Grasa de Jamón)				HR1-1 (Grasa de Jamón)			
	30 °C		22 °C		30 °C		22 °C		30 °C		22 °C	
Medio de Cultivo	Hongos	Bact/lev.	Hongos	Bact/lev.	Hongos	Bact/lev.	Hongos	Bact/lev.	Hongos	Bact/lev.	Hongos	Bact/lev.
Agar-Tri	0	28	0	8	7	53	0	29	203	369	136	680
9K-G	0	18	0	21	57	121	36	74	156	305	176	510
9K-Gam	0	0	0	0	60	157	21	100	100	630	0	0

Tabla 3.55. Selección de microorganismos en el "screening" primario de cepas aisladas en el muestreo realizado en ambientes lipófilos de grasa animal.

Muestras	Total		Posibles positivos		Positivos confirmados	
	Hongos	Bacterias/levaduras	Hongos	Bacterias/levaduras	Hongos	Bacterias
HR2-1	0	75	----	63	----	63
HR1-1	771	2494	403	3	378	3
HR1-2	181	534	25	----	15	----

La confirmación de la actividad transesterificadora de las cepas seleccionadas se realiza mediante un método colorimétrico en medio líquido, en el que se siguió el procedimiento descrito por Teng y Xu (Escobar-Nino et al., 2014; Sanchez, 2012; Teng & Xu, 2007).

En paralelo al análisis de las muestras, se realizan controles de hidrólisis. Se estima el valor máximo (0,019) entre el rango de absorbancias (de 0 a 0,019) obtenidas en todos los controles de hidrólisis, como valor de corte para considerar las cepas consideradas positivas en el screening secundario. Por tanto, tras el ensayo de transesterificación se consideraron positivas aquellas cepas que obtuvieron una absorbancia por encima de la absorbancia más alta alcanzada en los controles de hidrólisis (**Tabla 3.56**). Con esto se asume que estas cepas presentan capacidad transesterificadora. Este grupo se restringe por tanto a 20 cepas.

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tabla 3.56. Valores de absorbancia obtenidos en el ensayo de transesterificación. En cursiva, las cepas seleccionadas con valores de absorbancia superiores al más alto del control de hidrólisis.

Cepa HR2-1	Abs 410 nm	Cepa HR2-1	Abs 410 nm	Cepa HR2-1	Abs 410 nm	Cepa HR2-1	Abs 410 nm	Cepa HR2-1	Abs 410 nm	Cepa HR2-1	Abs 410 nm
1	<i>0.229</i>	13	<i>0.862</i>	25	0.024	37	0.118	49	0.023	61	0.114
2	0.102	14	0.069	26	<i>0.145</i>	38	0.001	50	0.018	62	<i>0.17</i>
3	<i>0.289</i>	15	0.077	27	- 0.001	39	-0.07	51	0.038	63	<i>0.184</i>
4	0.065	16	0.102	28	<i>0.275</i>	40	0.093	52	<i>0.152</i>	64	<i>0.317</i>
5	0.114	17	<i>0.28</i>	29	<i>0.292</i>	41	0.065	53	-0.018	65	<i>0.158</i>
6	<i>0.133</i>	18	<i>0.258</i>	30	<i>0.404</i>	42	- 0.001	54	0.05	66	0.101
7	0.096	19	0.087	31	0.062	43	0.005	55	-0.062		
8	0.095	20	<i>0.627</i>	32	0.061	44	0.001	56	-0.077		
9	0.088	21	0.109	33	0.039	45	0.001	57	0.023		
10	0.036	22	0.081	34	0.084	46	0.023	58	0.113		
11	0.098	23	<i>0.271</i>	35	- 0.001	47	0.067	59	0.215		
12	<i>0.14</i>	24	0.109	36	- 0.046	48	- 0.001	60	0.149		

b) DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ÉSTERES DE ÁCIDOS GRASOS POR LOS MICROORGANISMOS CON CAPACIDAD TRANSESTERIFICADORA MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE GASES.

Una vez obtenidos los extractos de las cepas seleccionadas en los anteriores procesos de screening, mediante liofilización con diálisis previa, se realiza su testado en la reacción de alcoholisis, en las condiciones experimentales indicadas en el **apartado 2.1.2** de materiales y métodos, incluyendo la correspondiente caracterización del biocombustible obtenido en cada caso (**apartado 2.1.3**), tanto analizando su composición por Cromatografía de Gases, como determinando su Viscosidad cinemática.

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

De las 3.103 cepas bacterianas y 952 cepas fúngicas aisladas de tres muestras diferentes, recogidas de grasa animal utilizando diferentes medios de cultivo y temperaturas, fueron seleccionados para realizar un análisis más prolijo 20 bacterias y 3 hongos. Debido a la baja conversión que presentaban los hongos estudiados (**Tabla 3.57**), el análisis se centró en el grupo bacteriano. La mayoría de las cepas bacterianas presentan una eficiencia (selectividad o porcentaje de FAEE+MG, o sea, biocombustible) comprendida entre el 20 y 80%. Por encima de este valor encontramos las cepas HR21.6, HR21.59, HR21.62B, HR21.63, HR21.63B y HR21.65 y en concreto, dos de ellas con más de un 90% de conversión y eficiencia de la misma (HR21.65 y HR21.59), como se aprecia en la **Tabla 3.58**.

Tabla 3.57. Viscosidad, composición, conversión y selectividad obtenidas en la transesterificación enzimática de aceite de girasol, empleando 3 extractos fúngicos procedentes de grasa animal, liofilizados, con diálisis previa. Condiciones de reacción, 37 °C, 24 horas, 300 rpm, operando con 6 ml de aceite, 1.75 ml etanol absoluto y 0.0125 ml de disolución acuosa de NaOH 10N.

Muestra	Viscosidad 40°C, (cSt)	FAE (%)	DG (%)	TG (%)	Conv. (%)	Sel. (%)
Girasol	34.5	3.4	29.9	66.7	33.3	3.4
Blanco ⁰	13.42	16.2	10.6	71.2	28.8	13.8
HR 11-59	18.63	34.10	6.17	59.73	40.27	34.10
HR 11-65	14.69	17.03	7.44	75.53	24.47	17.03
HR 12-14	17.16	31.35	8.15	60.50	39.50	31.35

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tabla 3.58. Viscosidad, composición, conversión y selectividad obtenidas en la transesterificación enzimática de aceite de girasol, empleando 20 extractos bacterianos procedentes de grasa animal, liofilizados, con diálisis previa. Condiciones de reacción, 37 °C, 24 horas, 300 rpm, operando con 6 ml de aceite, 1.75 ml etanol absoluto y 0.0125 ml de disolución acuosa de NaOH 10N.

Muestra	Viscosidad 40 °C, (cSt)	FAE (%)	DG (%)	TG (%)	Conv. (%)	Sel. (%)
Girasol	34.5	3.4	29.9	66.7	33.3	3.4
Blanco ⁰	9.4	13.8	41.9	44.3	55.7	13.8
HR21- 1	12.34	34.05	15.25	50.70	49.30	34.05
HR21-1B	13.39	51.85	7.03	41.12	58.88	51.85
HR21-3	15.58	3.6	0	96.4	3.6	3.6
HR21-3B	15.05	11.68	1.91	88.32	13.59	11.68
HR21-6	12.58	93.88	6.12	0	100	93.88
HR21-6B	13.76	91.87	8.13	0	100	91.87
HR21-13	14.81	24.81	2.88	72.31	27.69	24.81
HR21-13B	17.49	23.54	3.87	72.61	27.41	23.54
HR21- 17	19.60	25.16	2.39	72.45	27.55	25.16
HR21-17B	20.98	26.99	0.36	72.65	27.35	26.99
HR21- 18	12.94	17.06	0	82.94	17.06	17.06
HR21-18B	15.05	15.62	0	84.38	15.62	15.62
HR21-20	16.92	26.84	2.38	70.78	29.22	26.84
HR21-20B	14.00	13.79	0.12	86.09	13.91	13.79
HR21-23	14.40	32.78	4.35	62.87	37.13	32.78
HR21-23B	17.53	20.75	4.30	74.95	25.05	20.75
HR21- 26	12.50	70.84	0.13	29.03	70.97	70.84
HR21- 26B	12.78	74.81	0.13	25.06	74.94	74.81
HR21- 28	19.32	35.36	5.59	59.05	40.95	35.36
HR21-28B	20.09	35.42	4.55	80.03	39.97	35.42
HR21-29	17.57	30.34	2.92	66.74	33.26	30.34
HR21-29B	20.09	14.64	5.03	80.33	19.67	14.64
HR21-30	19.92	38.91	2.12	58.97	41.03	38.91
HR21- 30B	18.22	28.99	0	71.01	28.99	28.99
HR21-52	18.34	13.22	0	86.78	13.22	13.22
HR21-52B	16.52	36.01	0	63.99	36.01	36.01
HR21-59	10.71	90.10	9.90	0	100	90.10
HR21-59B	12.74	55.53	26.78	17.69	82.31	55.53
HR21-60	18.06	26.52	0	73.48	26.52	26.52
HR21-60B	17.48	30.48	0.1	69.42	30.58	30.48
HR21-61	19.14	27.32	0	72.68	27.32	27.32
HR21-61B	19.24	22.13	4.14	73.73	26.27	22.13
HR21-62	13.59	75.58	11.14	13.28	86.72	75.58
HR21-62B	12.78	91.25	8.75	0	100	91.25
HR21- 63	15.70	89.68	10.32	0	100	89.68
HR21-63B	10.18	88.99	11.01	0	100	88.99

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tabla 3.58 (continuación).

Muestra	Viscosidad 40 °C, (cSt)	FAE (%)	DG (%)	TG (%)	Conv. (%)	Sel. (%)
Girasol	34.5	3.4	29.9	66.7	33.3	3.4
Blanco ⁰	9.4	13.8	41.9	44.3	55.7	13.8
HR21-64	19.59	24.69	0	75.31	24.69	24.69
HR21-64B	20.87	7.92	0	92.08	7.92	7.92
HR21-65	18.58	90.04	0	9.96	90.04	90.04
HR21-65B	18.06	51.98	0	48.02	51.98	51.98
HR21-66	19.72	13.27	0.18	86.55	13.45	13.27
HR21-66B	19.68	17.52	0.21	82.27	17.73	17.52

c) ESTUDIO DEL RENDIMIENTO DE LAS CEPAS MÁS EFICACES.

Con las cepas que han resultado más eficaces (HR21-26, HR21-65) se comprueba la evolución del rendimiento a lo largo del tiempo de reacción y aplicando varios ciclos de reacción reutilizando el correspondiente sistema biocatalítico. Los resultados obtenidos se recogen en las **Tabla 3.59** a **Tabla 3.62**, se hacen los ensayos por duplicado, lo que permite determinar la reproducibilidad del método.

d) CARACTERIZACIÓN FILOGENÉTICA DE LAS CEPAS MÁS EFICACES.

Los resultados del análisis filogenético de las muestras de grasa animal, como se aprecia en la **Figura 3.63**, revelaron que un grupo de 13 cepas (HR21.3, HR21.6, HR21.12, HR21.13, HR21.17, HR21.20, HR21.28, HR21.29, HR21.30, HR21.52, HR21.62, HR21.63 y HR21.65), estaban emparentadas con *Bacillus stratosphericus* GD65; 5 cepas (HR21.18, HR21.23, HR21.26, HR2159 y HR21.60) mostraron un porcentaje de identidad de 100% excepto HR21.23 con un 99% con el taxón en el que están presentes *Bacillus aerophilus* strain 28K y *Bacillus altitudinis* type strain 41KF26 y una

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

cepa, HR21.64 con un 99% de identidad, con *Bacillus aerius* strain 24K. Con respecto a la cepa HR21.1, podemos encuadrarla en el género *Bacillus* pero no aparece agrupada con precisión a ninguna de las cepas tipo utilizadas para la construcción del árbol filogenético.

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tabla 3.59. Rendimiento de la lipasa HR21- 26 operando en las mismas condiciones de reacción en sucesivos ciclos de reacción (cada 60 min.) a 37 °C, 300 rpm, con 6 ml de aceite, 1.75 ml etanol absoluto y 0.0125 ml de disolución acuosa de NaOH 10N).

Muestra	Viscosidad (cSt)	FAEE (%)	DG (%)	TG (%)	Conversión (%)	Selectividad (%)
Girasol	34.5	3.4	29.9	66.7	33.3	3.4
Blanco ⁰	13.42	16.2	10.6	71.2	28.8	13.8
26-I						
1º h	-----	60.68	15.14	24.18	75.82	60.68
2º h	-----	47.30	12.78	39.92	60.08	47.30
3º h	-----	48.63	19.45	31.92	68.08	48.63
4º h	-----	50.47	6.39	43.14	56.86	50.47
5º h	-----	54.25	11.12	34.63	65.37	54.25
6º h	-----	92.36	7.14	0	100	92.36
7º h	-----	45.51	2.69	51.80	48.20	45.51
8º h	-----	71.07	4.04	24.89	75.11	71.07
...	-----					
24 h	9.6	90.93	9.07	0	100	90.93
26-II						
1º h	-----	86.70	13.30	0	100	86.70
2º h	-----	84.38	15.62	0	100	84.38
3º h	-----	84.75	15.25	0	100	84.75
4º h	-----	82.85	17.15	0	100	82.85
5º h	-----	83.83	16.17	0	100	83.83
6º h	-----	85.56	14.44	0	100	85.56
...	-----					
24 h	10.30	85.53	14.47	0	100	85.53
26-III						
1º h	-----	89.28	4.64	6.08	93.92	89.28
2º h	-----	73.47	2.08	24.45	75.55	73.47
3º h	-----	93.97	6.03	0	100	93.97
4º h	-----	76.70	5.73	17.57	82.43	76.70
5º h	-----	91.94	8.06	0.22	99.78	91.94
6º h	-----	87.23	8.50	4.27	95.73	87.23
7º h	-----	81.44	10.86	7.70	92.30	81.44
8º h	-----	91.67	8.33	0	100	91.67
...	-----					
24 h	13.84	88.23	11.77	0	100	88.23

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tabla 3.59 (continuación).

Muestra	Viscosidad (cSt)	FAEE (%)	DG (%)	TG (%)	Conversión (%)	Selectividad (%)
26-IV	9.41	39.89	26.09	34.01	65.99	39.89
26-V	16.76	90.92	9.08	0	100	90.92

Tabla 3.60. Rendimiento de la lipasa HR21- 26B (cada 60 min.) operando en las mismas condiciones de reacción comparado en sucesivos ciclos de reacción al ser “reutilizada”. (37 °C, 24 horas, min 300 rpm, operando con 6 ml de aceite, 1.75 ml etanol absoluto y 0.0125 ml de disolución acuosa de NaOH 10N).

Muestra	Viscosidad (cSt)	FAEE (%)	DG (%)	TG (%)	Conversión (%)	Selectividad (%)
Girasol	34.5	3.4	29.9	66.7	33.3	3.4
Blanco ⁰	13.42	16.2	10.6	71.2	28.8	13.8
26B-I						
1º h	-----	55.01	7.40	37.59	62.41	55.01
2º h	-----	60.29	21.25	18.46	81.54	60.29
3º h	-----	60.76	8.32	30.92	69.08	60.76
4º h	-----	69.85	9.75	20.40	79.60	69.85
5º h	-----	47.17	15.72	37.11	62.89	47.17
6º h	-----	87.31	12.69	0	100	87.31
7º h	-----	59.49	2.57	37.94	62.06	59.49
8º h	-----	79.53	11.48	8.99	91.01	79.53
...	-----					
24 h	12.42	80.39	5.26	14.35	85.65	80.39
26B-II						
1º h	-----	91.52	8.48	0	100	91.52
2º h	-----	85.06	14.94	0	100	85.06
3º h	-----	89.12	10.88	0	100	89.12
4º h	-----	89.07	10.93	0	100	89.07
5º h	-----	91.35	8.65	0	100	91.35
6º h	-----	81.04	18.96	0	100	81.04
...	-----					
24 h	11.32	85.50	14.50	0	100	85.50

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tabla 3. 60 (continuación).

Muestra	Viscosidad (cSt)	FAEE (%)	DG (%)	TG (%)	Conversión (%)	Selectividad (%)
26B-III						
1º h	-----	91.52	8.48	0	100	91.52
2º h	-----	76.13	6.54	17.33	82.67	76.13
3º h	-----	66.89	5.67	27.44	72.56	66.89
4º h	-----	82.50	8.22	9.28	90.72	82.50
5º h	-----	88.19	9.04	2.76	97.24	88.19
6º h	-----	91.24	8.76	0	100	91.24
7º h	-----	90.96	9.04	0	100	90.96
8º h	-----	96.40	8.64	3.60	96.40	96.40
...	-----					
24 h	12.94	89.26	10.74	0	100	89.26
26B-IV	9.86	71.67	28.33	0	100	71.67
26B-V	15.66	88.65	11.35	0	100	88.65

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tabla 3.61. Rendimiento de la lipasa HR21- 65 (cada 60 min.) operando en las mismas condiciones de reacción comparado en sucesivos ciclos de reacción al ser “reutilizada”. (37 °C, 24 horas, min 300 rpm, operando con 6 ml de aceite, 1.75 ml etanol absoluto y 0.0125 ml de disolución acuosa de NaOH10N).

Muestra	Viscosidad (cSt)	FAEE (%)	DG (%)	TG (%)	Conversión (%)	Selectividad (%)
Girasol	34.5	3.4	29.9	66.7	33.3	3.4
Blanco ⁰	13.42	16.2	10.6	71.2	28.8	13.8
65-I						
1 ^o h	-----	47.67	4.88	47.45	52.55	47.67
2 ^o h	-----	43.77	3.84	52.39	47.61	43.77
3 ^o h	-----	52.00	6.19	41.81	58.19	52.00
4 ^o h	-----	54.64	9.26	36.10	63.90	54.64
5 ^o h	-----	48.42	3.68	47.90	52.10	48.42
6 ^o h	-----	68.03	9.12	22.85	77.15	68.03
7 ^o h	-----	59.43	8.13	32.44	67.56	59.43
8 ^o h	-----	60.29	9.57	30.34	69.66	60.29
...	-----					
24 h	14.56	60.59	5.75	33.66	66.34	60.59
65-II						
1 ^o h	-----	66.36	6.75	26.89	73.11	66.36
2 ^o h	-----	67.56	9.12	25.32	76.68	67.56
3 ^o h	-----	86.75	10.61	2.64	97.36	86.75
4 ^o h	-----	70.00	2.75	27.25	72.75	70.00
5 ^o h	-----	87.93	11.63	0.44	99.56	87.93
6 ^o h	-----	80.01	6.35	13.64	86.36	80.01
...	-----					
24 h	11.89	82.15	17.85	0	100	82.15

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tabla 3. 61 (continuación).

Muestra	Viscosidad (cSt)	FAEE (%)	DG (%)	TG (%)	Conversión (%)	Selectividad (%)
65-III						
1º h	-----	68.36	6.39	25.24	74.76	68.36
2º h	-----	71.05	3.04	25.91	74.09	71.05
3º h	-----	90.20	9.80	0	100	90.20
4º h	-----	81.97	8.64	9.39	90.61	81.97
5º h	-----	85.05	14.26	0.69	99.31	85.05
6º h	-----	89.65	10.35	0	100	89.65
7º h	-----	87.54	9.92	2.54	97.46	87.54
8º h	-----	89.21	10.79	0	100	89.21
...	-----					
24 h	14.32	82.19	17.81	0	100	82.19
65-IV	11.81	87.29	12.71	0	100	87.29
65-V	17.16	82.9	17.1	0	100	82.9

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tabla 3.62. Rendimiento de la lipasa HR21- 65B (cada 60 min.) operando en las mismas condiciones de reacción comparado en sucesivos ciclos de reacción al ser “reutilizada”. (37 °C, 24 horas, min 300 rpm, operando con 6 ml de aceite, 1.75 ml etanol absoluto y 0.0125 ml de disolución acuosa de NaOH10N).

Muestra	Viscosidad (cSt)	FAEE (%)	DG (%)	TG (%)	Conversión (%)	Selectividad (%)
Girasol	34.5	3.4	29.9	66.7	33.3	3.4
Blanco ⁰	13.42	16.2	10.6	71.2	28.8	13.8
65B-I						
1º h	-----	48.37	18.59	33.04	66.96	48.37
2º h	-----	60.47	5.79	33.74	66.26	60.47
3º h	-----	56.01.	8.61	35.38	64.62	56.01
4º h	-----	46.33	5.10	48.57	51.43	46.33
5º h	-----	45.97	5.97	48.06	51.94	45.97
6º h	-----	77.82	9.96	12.22	87.78	77.82
7º h	-----	56.21	7.12	36.66	63.33	56.21
8º h	-----	58.78	9.72	31.50	68.50	58.78
...	-----					
24 h	14.20	84.62	10.93	4.43	95.57	84.62
65B-II						
1º h	-----	89.26	10.74	0	100	89.26
2º h	-----	68.75	6.81	24.44	75.56	68.75
3º h	-----	45.08	3.81	51.11	48.89	45.08
4º h	-----	73.31	26.69	19.75	80.25	73.31
5º h	-----	72.09	6.39	21.52	78.48	72.09
6º h	-----	96.52	3.48	0	100	96.52
...	-----					
24 h	13.80	73.97	12.97	13.06	86.94	73.97

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tabla 3. 62 (continuación).

Muestra	Viscosidad (cSt)	FAEE (%)	DG (%)	TG (%)	Conversión (%)	Selectividad (%)
65B-III						
1º h	-----	81.15	17.83	1.02	98.98	81.15
2º h	-----	42.21	5.61	52.18	47.82	42.21
3º h	-----	64.11	6.30	29.59	70.41	64.11
4º h	-----	57.78	9.31	32.91	67.09	57.78
5º h	-----	55.72	4.96	39.32	60.68	55.72
6º h	-----	62.91	8.44	28.65	71.35	62.91
7º h	-----	73.02	9.65	17.33	82.67	73.02
8º h	-----	68.59	11.64	19.77	80.23	68.59
...	-----					
24 h	12.70	78.61	21.39	0	100	78.61
65B-IV	9.73	85.57	14.43	0	100	85.57
65B-V	17.12	89.33	10.67	0	100	89.33

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

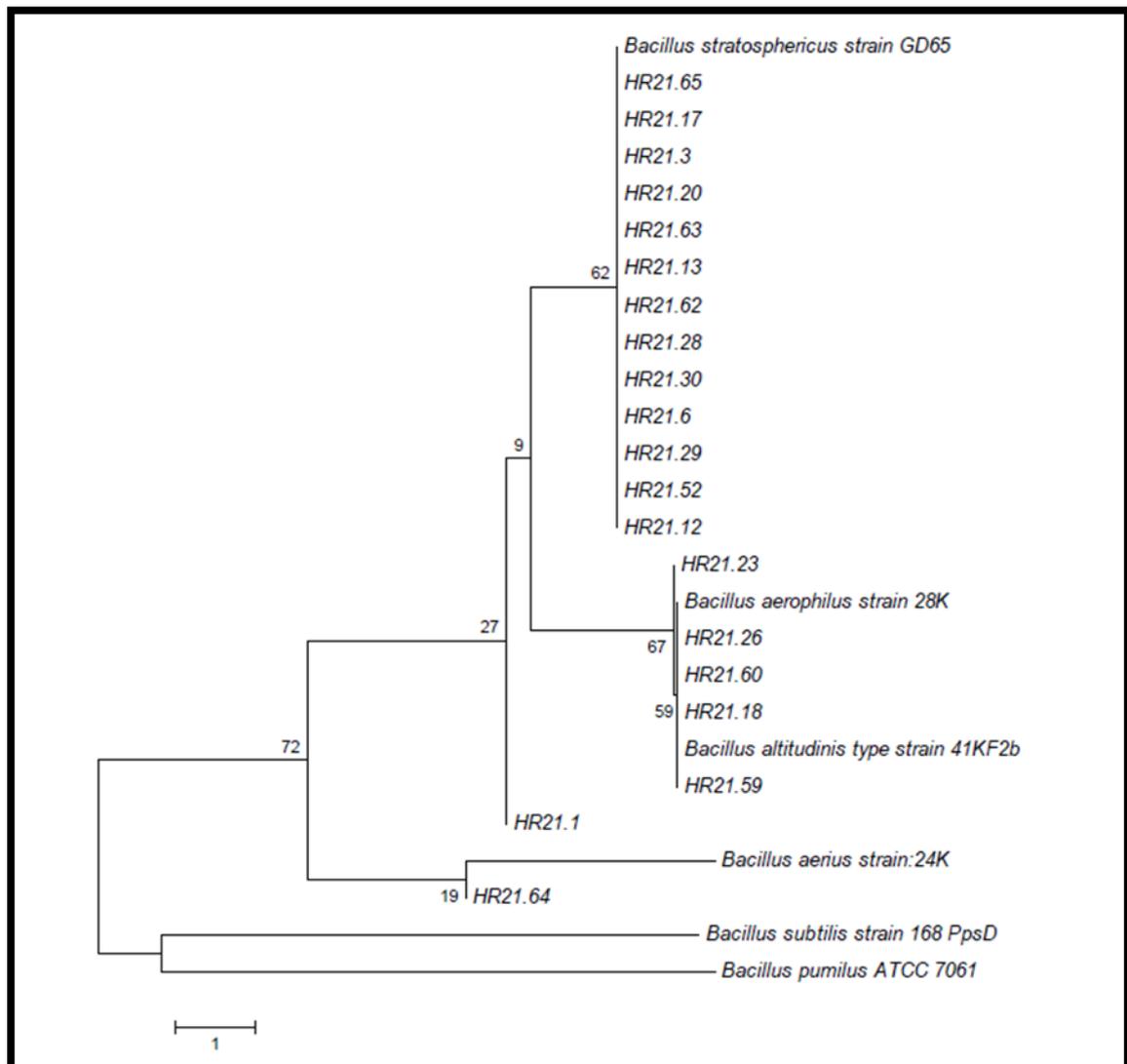


Figura 3.63. Árbol filogenético de las bacterias Gram positivas seleccionadas.

e) ESTUDIO COMPARATIVO DE DIFERENTES CONDICIONES y MEDIOS DE CULTIVO.

Tras sembrar las mismas cepas (HR21-6, HR21-59, HR21-62, HR21-63) en dos medios diferentes (LB y PYA), comprobamos que el microorganismo crece mejor y produce un extracto enzimático más eficaz en la reacción de etanolisis en el medio LB

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

que en el medio PYA (Y.-G. Kim et al., 2007), a pesar que en el primer medio a las 48 h de su crecimiento se lisa y muere, con lo que lógicamente hay que proceder a su extracción antes de dicho tiempo de cultivo (**Tabla 3.64**).

Tabla 3.64. Comparación del Resultado obtenido en la transesterificación enzimática de aceite de girasol empleando un extracto liofilizado, previamente dializado, de las muestras HR21-6, HR21-59, HR21-62, HR21-63, habiendo crecido en diferente medio de cultivo (medio LB vs. Medio PYA). Condiciones de operación, 37 °C, 24 horas, 300 rpm, operando con 6 ml de aceite, 1.75 ml etanol absoluto y 0.0125 ml de disolución acuosa NaOH 10N.

Muestra	Viscosidad 40 °C, (cSt)	FAE (%)	DG (%)	TG (%)	Conv. (%)	Sel. (%)
Girasol	34.5	3.4	29.9	66.7	33.3	3.4
Patrón	13.42	16.2	10.6	71.2	28.8	13.8
LB Tributirina (2%) 72 h						
6-LB	9.10	54.06	10.60	35.34	64.66	54.06
59-LB	12.46	39.68	3.00	57.32	42.68	39.68
62-LB	12.38	47.52	5.26	47.22	52.78	47.52
63-LB	15.14	44.25	1.95	53.80	46.20	44.25
PYA (48h)						
6-PYA	13.76	49.83	4.44	45.73	54.27	49.83
59-PYA	16.16	24.19	3.95	71.86	28.14	24.19
62-PYA	13.47	31.99	3.00	65.01	34.99	31.99
63-PYA	15.34	23.55	3.24	73.21	26.79	23.55

f) ESTUDIO EXHAUSTIVO DE LA CEPA HR21-6 (G. BACILLUS).

Se realiza un exhaustivo estudio de crecimiento con una de las cepas seleccionadas más eficaces, la HR21-6, caracterizada como perteneciente al G. *Bacillus*. Comparando ambos medios de cultivo, LB vs. PYA (con y sin tributirina), donde la cepa ha sido cultivada con diferentes tiempos de crecimiento en cada uno de ellos (48 h y 72 h). Los cuatro tipos de cepa, en función de ambos tipos de medios y ambos tiempos

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

de crecimiento, son testadas en la reacción de etanolisis, en las condiciones estándar, estudiándose la evolución del rendimiento a lo largo del tiempo de reacción, así como la estabilidad del biocatalizador al ser reutilizado en 10 ciclos de reacción. Todos estos resultados son mostrados en las **Tablas 3.65 a 3.70**.

Tabla 3.65. Rendimiento del extracto lipolítico de la cepa HR21-6 (*G. Bacillus*), cultivada en diferentes medios de cultivo (LB o PYA) con y sin tributirina, durante 48 h, obtenidos por un proceso de purificación simple (diálisis y liofilización) en las condiciones de reacción estándares: 6 ml aceite, 1.75 ml EtOH, 650µl de extracto enzimático, 37 °C, 50 µl de NaOH 10 N, con agitación mayor de 300 rpm, durante 24 h.

Muestra	Visc 40 °C (cSt)	Conv (%)
ACEITE DE GIRASOL	34.53	33.32
BLANCO ⁰	13.42	28.82
BLANCO-LB	7,99	23,87
BLANCO-PYA	9,86	30,03
48 h	LB	7,83
	LB -TB	10,19
	PYA	8,48
	PYA -TB	7,87

Blanco⁰ - Reacción sin lipasa

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tabla 3.66. Rendimiento del extracto lipolítico de la cepa HR21-6 (*G. Bacillus*), cultivada en diferentes medios de cultivo (LB o PYA) con y sin tributirina, durante 72 h, obtenidos por un proceso de purificación simple (diálisis y liofilización) en las condiciones de reacción estándares: 6 ml aceite, 1.75 ml EtOH, 650µl de extracto enzimático, 37 °C, 50 µl de NaOH 10 N, con agitación mayor de 300 rpm, durante 24 h.

Muestra		Visc 40 °C (cSt)	Conv (%)
ACEITE DE GIRASOL		34.53	33.32
BLANCO ⁰		13.42	28.82
BLANCO-LB		7,99	23,87
BLANCO-PYA		9,86	30,03
72 h	LB	14,12	85,52
	LB -TB	14,32	100
	PYA	13,11	100
	PYA -TB	15,14	87,94

Blanco⁰ - Reacción sin lipasa

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tabla 3.67. Evolución del Rendimiento a lo largo del tiempo de reacción del extracto lipolítico de la cepa HR21-6 (*G. Bacillus*), cultivada en diferentes medios de cultivo (LB o PYA) con y sin tributirina, durante 48 h, obtenidos por un proceso de purificación simple (diálisis y liofilización) en las condiciones de reacción estándares: 6 ml aceite, 1.75 ml EtOH, 650µl de extracto enzimático, 37 °C, 50 µl de NaOH 10 N, con agitación mayor de 300 rpm, durante 24 h.

48 h	LB	LB -TB	PYA	PYA -TB
Yield(%)	Conv	Conv	Conv	Conv
1 h	38,02	100	37,67	59,04
2 h	51,30	54,72	93,11	56,28
3 h	77,11	100	100	71,9
4 h	75,46	62	59,54	42,64
5 h	58,32	100	100	100
6 h	100	100	93,11	85,04
7 h	94,19	100	100	100
8 h	100	100	100	89,93
24 h	100	91,36	66,79	100

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tabla 3.68. Evolución del Rendimiento a lo largo del tiempo de reacción del extracto lipolítico de la cepa HR21-6 (*G. Bacillus*), cultivada en diferentes medios de cultivo (LB o PYA) con y sin tributirina, durante 72 h, obtenidos por un proceso de purificación simple (diálisis y liofilización) en las condiciones de reacción estándares: 6 ml aceite, 1.75 ml EtOH, 650µl de extracto enzimático, 37 °C, 50 µl de NaOH 10 N, con agitación mayor de 300 rpm, durante 24 h.

72 h	LB	LB -TB	PYA	PYA -TB
Yield(%)	Conv	Conv	Conv	Conv
1 h	77	100	96	100
2 h	100	100	100	100
3 h	100	96,84	100	100
4 h	100	100	96,54	100
5 h	100	100	100	100
6 h	100	97,08	100	100
7 h	100	100	100	100
8 h	100	100	100	87,8
24 h	85,52	100	100	87,94

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tabla 3.69. Rendimiento de la Reacción de Transesterificación en sucesivas reutilizaciones del mismo sistema biocatalítico, bajo condiciones de reacción estándares: 6 ml aceite, 1.75 ml EtOH, 30°C, 25 µL de NaOH 10 N, agitación mayor de 300 rpm, durante 6 h. Como biocatalizador se aplica 0.5 g de extracto enzimático de la cepa HR21-6 (*G. Bacillus*), cultivado durante 48 h.

48 h	Visc 40 °C (cSt)	Conv (%)
ACEITE DE GIRASOL	34.53	33.32
BLANCO ⁰	13.42	28.82
BLANCO-LB	7.99	23.87
BLANCO-PYA	9.86	30.03
1ª Reacción:		
LB	7.83	100
LB -TB	10.13	91.36
PYA	8.48	66.79
PYA -TB	7.87	100
2º Reuso:		
LB	9.82	33.19
LB -TB	6.49	26.69
PYA	8.40	100
PYA -TB	8.89	37.79
3er Reuso:		
LB	7.87	58.68
LB-TB	9.58	33.86
PYA	8.22	59.09
PYA-TB	7.59	28.27
4º Reuso:		
LB	9,58	82,72
LB -TB	5,03	90
PYA	10,30	39,37
PYA -TB	10,06	97,52
5º Reuso:		
LB	9.94	100
LB -TB	11.24	95.75
PYA	9.70	71.12
PYA -TB	10.67	83.45
6º Reuso:		
LB	11.61	97.54
LB -TB	11.20	41.15
PYA	10.06	76.47
PYA -TB	10.75	66.21
7º Reuso:		
LB	9.86	54.00
LB -TB	10.14	44.84
PYA	9.90	42.36
PYA -TB	10.15	39.84
8º Reuso:		
LB	10.75	51.31
LB -TB	10.10	59.99
PYA	10.22	44.28
PYA -TB	9.86	55.40

Blanco⁰ - Reacción sin lipasa

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tabla 3.69 (continuación).

48 h	Visc 40 °C (cSt)	Conv (%)
9º Reuso:		
LB	9.90	60.14
LB -TB	10.10	68.25
PYA	10.10	45.16
PYA -TB	9.62	61.86
10º Reuso:		
LB	10.27	65.20
LB -TB	10.23	68.56
PYA	10.19	44.13
PYA -TB	9.86	46.49

Tabla 3.70. Rendimiento de la Reacción de Transesterificación en sucesivas reutilizaciones del mismo sistema biocatalítico, bajo condiciones de reacción estándares: 6 ml aceite/ 1.75 ml EtOH, 30°C, 25 µL de NaOH 10 N, agitación mayor de 300 rpm, durante 6 h. Como biocatalizador se aplica 0.5 g de extracto enzimático de la cepa HR21-6 (*G. Bacillus*), cultivado durante 72 h.

72 h	Visc 40 °C (cSt)	Conv (%)
ACEITE DE GIRASOL	34.53	33.32
BLANCO ⁰	13.42	28.82
BLANCO-LB	7.99	23.87
BLANCO-PYA	9.86	30.03
1ª Reacción:		
LB	14.12	85.52
LB -TB	14.32	100
PYA	13.11	100
PYA -TB	15.13	87.95
2º Reuso:		
LB	16.23	100
LB -TB	15.26	100
PYA	15.17	100
PYA -TB	14.89	100
3º Reuso:		
LB	13.67	43.71
LB-TB	13.03	43.00
PYA	13.03	43.54
PYA-TB	13.55	24.54
4º Reuso:		
LB	12.74	44.66
LB -TB	12.62	39.81
PYA	12.21	29.30
PYA -TB	12.13	51.63
5º Reuso:		
LB	12.37	98.46
LB -TB	13.22	90.38
PYA	15.18	25.97
PYA -TB	13.96	31.31

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tabla 3.70 (continuación).

72 h	Visc 40 °C (cSt)	Conv (%)
6º Reuso:		
LB	12.17	25.44
LB -TB	14.16	88.77
PYA	13.76	77.72
PYA -TB	11.85	26.85
7º Reuso:		
LB	12.42	44.93
LB -TB	11.20	100
PYA	13.15	45.99
PYA -TB	12.74	100
8º Reuso:		
LB	13.19	97.66
LB -TB	13.07	64.26
PYA	13.22	100
PYA -TB	13.31	82.41
9º Reuso:		
LB	12.34	60.45
LB -TB	14.00	73.65
PYA	13.43	24.46
PYA -TB	13.63	19.37
10º Reuso:		
LB	13.55	33.32
LB -TB	12.74	18.65
PYA	12.25	70.81
PYA -TB	12.58	85.35

Blanco⁰ - Reacción sin lipasa

Si procedemos a efectuar un proceso de purificación del extracto, obtenido a partir de esta cepa, en una columna de intercambio hidrofóbico, HiTrap HIC, de 5ml, con matriz de fenil sefarosa, mediante un sistema de FPLC, comprobamos que no se obtienen resultados superiores (**Tabla 3.71**), quizás debido a la baja cantidad de proteína que queda después de la purificación.

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tabla 3.71. Resultados obtenidos en la transesterificación enzimática de aceite de girasol empleando un extracto liofilizado, previamente dializado, sometido a un proceso de purificación de la muestra HR21-6 (*G. Bacillus*). Condiciones de operación, 37 °C, 24 horas, 300 rpm, operando con 6 mL de aceite, 1.75 ml etanol absoluto y 0.0125 ml de disolución acuosa de NaOH 10N.

Muestra	Visc 40 °C (cSt)	Sel (%)	Conv (%)
ACEITE DE GIRASOL	34.53	3.45	33.32
BLANCO ⁰	13.42	16.24	28.82
6-Purificado	10,87	67,16	71,04

3.4. REFERENCIAS.

- Blanco, R. M., Terreros, P., Fernandez-Perez, M., Otero, C., & Diaz-Gonzalez, G. (2004). Functionalization of mesoporous silica for lipase immobilization - Characterization of the support and the catalysts. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 30(2), 83-93. doi: 10.1016/j.molcatb.2004.03.012
- Caballero, V., Bautista, F. M., Campelo, J. M., Luna, D., Marinas, J. M., Romero, A. A., . . . Giordano, G. (2009). Sustainable preparation of a novel glycerol-free biofuel by using pig pancreatic lipase: Partial 1,3-regiospecific alcoholysis of sunflower oil. *Process Biochemistry*, 44(3), 334-342. doi: 10.1016/j.procbio.2008.11.015
- Chen, X., Du, W., & Liu, D. (2008). Response surface optimization of biocatalytic biodiesel production with acid oil. *Biochemical Engineering Journal*, 40(3), 423-429. doi: 10.1016/j.bej.2008.01.012
- Escobar-Nino, A., Luna, C., Luna, D., Marcos, A. T., Canovas, D., & Mellado, E. (2014). Selection and Characterization of Biofuel-Producing Environmental Bacteria Isolated from Vegetable Oil-Rich Wastes. *Plos One*, 9(8). doi: 10.1371/journal.pone.0104063
- Gascon, V. (2014). *Avances en las propiedades de biocatalizadores: Diseño y obtención de materiales mesoporosos ordenados como soportes para la inmovilización no covalente de enzimas.* (Tesis Doctoral), Instituto de Catálisis y Petroleoquímica, CSIC, Madrid. (<http://hdl.handle.net/10261/112074>)
- Ghadge, S. V., & Raheman, H. (2006). Process optimization for biodiesel production from mahua (*Madhuca indica*) oil using response surface methodology. *Bioresource Technology*, 97(3), 379-384. doi: 10.1016/j.biortech.2005.03.014
- Kim, H. S., Jeon, J. W., Lee, H. W., Park, Y. I., Seo, W. T., Oh, H. M., . . . Yoon, B. D. (2002). Extracellular production of a glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipid, from *Candida antarctica*. *Biotechnology Letters*, 24(3), 225-229. doi: 10.1023/a:1014100422857
- Kim, Y.-G., Hwang, C. Y., Yoo, K. W., Moon, H. T., Yoon, J.-H., & Cho, B. C. (2007). *Pelagibacillus goriensis* gen. nov., sp nov., a moderately halotolerant bacterium isolated from coastal water off the east coast of Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57, 1554-1560. doi: 10.1099/ijs.0.64820-0
- Li, W., Du, W., & Liu, D. (2007). Optimization of whole cell-catalyzed methanolysis of soybean oil for biodiesel production using response surface methodology. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 45(3-4), 122-127. doi: 10.1016/j.molcatb.2007.01.002
- Luna, C., Sancho, E., Luna, D., Caballero, V., Calero, J., Posadillo, A., . . . Romero, A. A. (2013). Biofuel that Keeps Glycerol as Monoglyceride by 1,3-Selective

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

- Ethanolysis with Pig Pancreatic Lipase Covalently Immobilized on AlPO₄ Support. *Energies*, 6(8), 3879-3900. doi: 10.3390/en6083879
- Luna, C., Sancho, E. D., Luna, D., Calero, J., Verdugo, C., Posadillo, A., . . . Romero, A., A. (2014). PRODUCTION OF A BIOFUEL SIMILAR TO CONVENTIONAL BIODIESEL THAT AVOIDS RESIDUAL GLYCEROL BY USING LIPOPAN 50BG, A LOW COST COMMERCIAL *THERMOMYCES LANUGINOSUS* LIPASE. *Récents Progrès en Génie des Procédés*, 106(GPE – 4th International Congress on Green Process Engineering 7-10 April 2014 – Sevilla (Spain)).
- Luna, C., Verdugo, C., Sancho, E. D., Luna, D., Calero, J., Posadillo, A., . . . Romero, A. A. (2014a). A Biofuel Similar to Biodiesel Obtained by Using a Lipase from *Rhizopus oryzae*, Optimized by Response Surface Methodology. *Energies*, 7(5), 3383-3399. doi: 10.3390/en7053383
- Luna, C., Verdugo, C., Sancho, E. D., Luna, D., Calero, J., Posadillo, A., . . . Romero, A. A. (2014b). Biocatalytic Behaviour of Immobilized *Rhizopus oryzae* Lipase in the 1,3-Selective Ethanolysis of Sunflower Oil to Obtain a Biofuel Similar to Biodiesel. *Molecules*, 19(8), 11419-11439. doi: 10.3390/molecules190811419
- Luna, C., Verdugo, C., Sancho, E. D., Luna, D., Calero, J., Posadillo, A., . . . Romero, A. A. (2014c). Production of a biodiesel-like biofuel without glycerol generation, by using Novozym 435, an immobilized *Candida antarctica* lipase. *Bioresources and Bioprocessing*, 1(11). doi: doi:10.1186/s40643-014-0011-y
- Luna, D., Posadillo, A., Caballero, V., Verdugo, C., Bautista, F. M., Romero, A. A., . . . Calero, J. (2012). New Biofuel Integrating Glycerol into Its Composition Through the Use of Covalent Immobilized Pig Pancreatic Lipase. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(8), 10091-10112. doi: 10.3390/ijms130810091
- Mellado, E., Escobar, A., Canovas, D., & Luna, D. (2013). *Spanish Patent*, Patent No.: U. o. S. University of Cordoba.
- Rivera, I., Villanueva, G., & Sandoval, G. (2009). Biodiesel production from animal grease wastes by enzymatic catalysis. *Grasas Y Aceites*, 60(5), 468-474. doi: 10.3989/gya.021409
- Salis, A., Svensson, I., Monduzzi, M., Solinas, V., & Adlercreutz, P. (2003). The atypical lipase B from *Candida antarctica* is better adapted for organic media than the typical lipase from *Thermomyces lanuginosa*. *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*, 1646(1-2), 145-151. doi: 10.1016/s1570-9639(02)00556-3
- Sanchez, L. (2012). *Desarrollo de sistemas biológicos para la obtención de energías renovables (biodiesel). Lipasas microbianas*. (Trabajo Fin de Master), Universidad de Sevilla (US), Sevilla.
- Teng, Y., & Xu, Y. (2007). A modified para-nitrophenyl palmitate assay for lipase synthetic activity determination in organic solvent. *Analytical Biochemistry*, 363(2), 297-299. doi: 10.1016/j.ab.2007.01.026

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

- Verdugo, C., Luna, D., Posadillo, A., Sancho, E. D., Rodriguez, S., Bautista, F., . . . Romero, A. A. (2011). Production of a new second generation biodiesel with a low cost lipase derived from *Thermomyces lanuginosus*: Optimization by response surface methodology. *Catalysis Today*, 167(1), 107-112. doi: 10.1016/j.cattod.2010.12.028
- Verdugo, C., Luque, R., Luna, D., Hidalgo, J. M., Posadillo, A., Sancho, E. D., . . . Romero, A. A. (2010). A comprehensive study of reaction parameters in the enzymatic production of novel biofuels integrating glycerol into their composition. *Bioresource Technology*, 101(17), 6657-6662. doi: 10.1016/j.biortech.2010.03.089
- Yucel, Y. (2012). Optimization of biocatalytic biodiesel production from pomace oil using response surface methodology. *Fuel Processing Technology*, 99, 97-102. doi: 10.1016/j.fuproc.2012.02.008



Ramón Lapayese del Río (1956)

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En este capítulo se exponen y valoran los resultados obtenidos en los trabajos experimentales llevados a cabo, fundamentalmente encaminados a desarrollar, optimizar y hacer más viable la producción enzimática de Ecodiésel a escala comercial. En este sentido se han estudiado diversos sistemas biocatalíticos (lipasas comerciales, libres o inmovilizadas, lipasas libres comerciales inmovilizadas en laboratorio o extractos enzimáticos lipasídicos obtenidos a partir de cultivos microbianos líquidos). Todos los ensayos se han efectuado empleando el mismo sistema de reacción, tanque tipo "batch" con agitación y temperatura constante, donde se desarrolla la transesterificación, o etanolisis, parcial de aceite de girasol. Los productos y rendimiento de las reacciones, ya sea a lo largo del tiempo o en diferentes reutilizaciones del biocatalizador, se caracterizan en todos los casos mediante Cromatografía de Gases y medidas de la viscosidad cinemática. En la **Tabla 4.1.**, se muestran las diferentes metodologías y sistemas biocatalíticos aplicados.

La discusión de los diferentes resultados sigue el mismo orden que la metodología experimental indicada en el Plan de Trabajo, según se resume en la **Tabla 4.1.** Finalmente se realiza una valoración global, en la que se compararán entre sí todos los sistemas biocatalíticos investigados, estimando en cada caso las ventajas, inconvenientes, puntos fuertes, flaquezas o debilidades, de cada uno de ellos. Así mismo, se pondrán en valor los principales resultados conseguidos, así como algunas hipótesis que justifiquen los mismos.

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Tabla 4.1. Metodologías de trabajo experimental empleado en los diferentes sistemas biocatalíticos investigados.

	Biocatalizador	Metodología	VARIABLES ESTUDIADAS	
LIPASAS COMERCIALES	Lipopan 50 BG (C. Luna, E. D. Sancho, et al., 2014)	OVAT	- Temperatura - Volumen de disolución NaOH 10 N - Cantidad de enzima	
	Blanco (sin enzima)	OVAT	- Temperatura	
	CALB	N435 (C. Luna, C. Verdugo, et al., 2014c)	OVAT	- Peso de biocatalizador
			ANOVA	- Temperatura - Ratio TG/EtOH - Volumen de disolución NaOH 10 N
		CALB inmovilizada (Gascon, 2014)		- Inmovilización en soporte PMO y MS. - Eficacia: Rendimiento a lo largo del tiempo de reacción. - Estabilidad: Reutilización
				- Eficacia: Rendimiento a lo largo del tiempo de reacción. - Estabilidad: Reutilización
EXTRACTOS ENZIMÁTICOS	Cepas CECT		- Determinación de los Medios idóneos de cultivo. - Tiempo de crecimiento óptimo del cultivo.	
			- Obtención del extracto (Liofilización con diálisis previa).	
			- Eficacia: Rendimiento a lo largo del tiempo de reacción. - Estabilidad: Reutilización	
	Cepas microbianas "silvestres" (recolectadas en ambientes lipófilos vegetal y animal) (Escobar-Nino et al., 2014; Sanchez, 2012)		- Toma de muestras - Cultivo de cepas - Obtención del extracto (Liofilización con diálisis previa) - Screening Primario: halo de hidrólisis - Screening Secundario: Capacidad Transesterificadora - Eficacia: Rendimiento a lo largo del tiempo de reacción. - Estabilidad: Reutilización	

4.1. LIPOPAN.

4.1.1. Optimización de las condiciones de reacción de la etanolisis enzimática selectiva para obtener Ecodiésel.

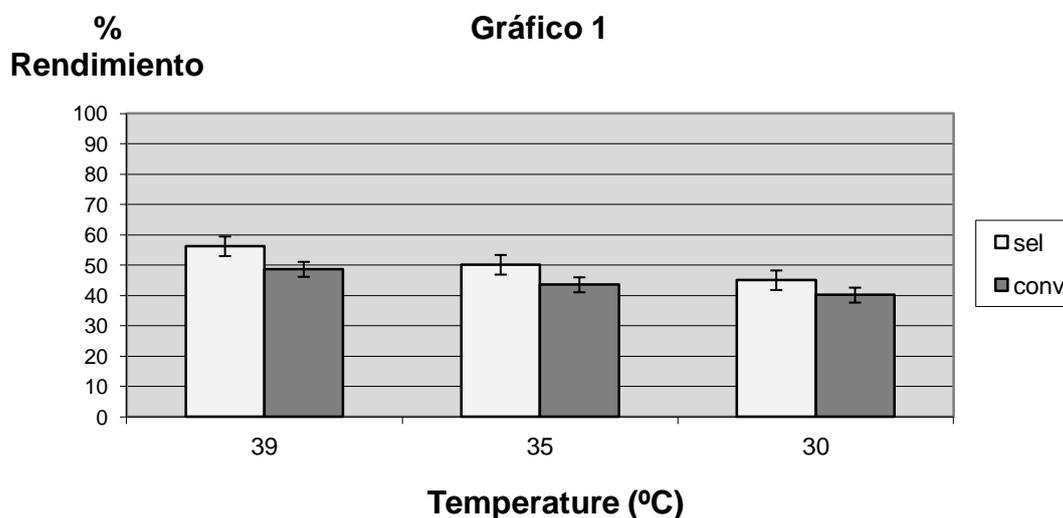
Las condiciones de operación óptimas del proceso de etanolisis para los sistemas biocatalíticos se establecen realizando un estudio (temperatura, pH, cantidades relativas de lipasa, aceite/etanol) empleando una lipasa comercial de referencia *LIPOPAN 50 BG* (Novozime®) (extraída de *Thermomyces lanuginosus* e insertada en *Aspergillus oryzae*), previamente estudiada (Cristobal Verdugo et al., 2011). Se trata de una lipasa de relativo bajo costo que es aplicada habitualmente en la industria de la panadería como emulgente. Estos resultados nos sirven de referencia para el estudio de esta reacción empleando los restantes sistemas biocatalíticos investigados, como CALB inmovilizada en forma no covalente, o empleando extractos enzimáticos de menor pureza (liofilizados con o sin diálisis previa) de cepas CALB estándar adquiridas comercialmente, o de microorganismos silvestres muestreados, cuyas características serán previsiblemente más variables, diferentes y/o cambiantes.

En lo que respecta a la influencia de la temperatura en la eficiencia de la reacción enzimática, se realiza ésta inicialmente sin lipasa (reacción del blanco) para poder estimar qué parte de la reacción obtenida en los resultados es debida al proceso puramente químico y determinar así el efecto de la temperatura por sí sola en el rendimiento de la reacción enzimática. Así, como se aprecia en la **Figura 4.1**, a medida que aumenta la temperatura, la reacción en “blanco” es más efectiva, con mayor selectividad, y menor viscosidad. A fin de excluir lo más posible el efecto del proceso químico del blanco, las reacciones enzimáticas se llevan a cabo a 30 °C, para así

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

evaluar la eficacia biocatalítica de la lipasa, al excluir lo máximo posible la interferencia que se produce a las temperaturas más elevadas, que aumentan en mayor proporción la velocidad de la reacción no biocatalizada.

Figura 4.1. Rendimiento de las reacciones en “blanco” operando a diferentes temperaturas en condiciones estándar: 6 ml aceite de girasol, 1.75 ml de Etanol absoluto y 0.0125 ml de NaOH 10 N, durante 24 horas. Conversión, selectividad (Gráfico 1) y Viscosidad en centiStockes (Gráfico 2).



A partir de los resultados recogidos en la **Tabla 3.2**, se concluye que la presencia de una mínima cantidad de NaOH es fundamental para obtener de forma eficiente la reacción de transesterificación enzimática, dado que su presencia influye de forma muy positiva en el rendimiento de la reacción. La reacción realizada con la lipasa sin sosa alguna aunque viable, no alcanza valores comparables a los obtenidos con sólo 0,0125 ml de NaOH 10N. De esta manera, una cantidad de 0.0125-0,025 ml de NaOH, para 5 mmol de aceite de girasol es una relación óptima para obtener el mejor

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

rendimiento enzimático. Blancos realizados sin lipasa, y sin las concentraciones óptimas de NaOH, originan valores mínimos de actividad, similares a los de la lipasa sin NaOH, generando una conversión de menos del 10% del material de partida, de modo que una contribución importante debida a la catálisis básica homogénea se puede excluir en las condiciones de reacción seleccionadas como condiciones estándar. Es decir, la acción biocatalítica de la lipasa Lipopan 50 BG se debe a la acción conjunta de mínimas cantidades de lipasa y mínimas cantidades de disoluciones acuosas de NaOH muy concentrada.

Esto se aprecia claramente en la **Figura 4.2.**, donde se comprueba que el aumento de la cantidad de NaOH no mejora prácticamente el rendimiento obtenido con la mínima cantidad empleada (0.0125 mL). Comparando con la **Figura 4.1.** se concluye fácilmente que la conversión y selectividad se duplican prácticamente por la acción de la lipasa, operando bajo las condiciones que hemos establecido como estándar, en las que se incluye una mínima cantidad de disolución acuosa de NaOH. En este caso, al ser constante la cantidad de la lipasa y mantener unas conversiones elevadas, el TOF y la Actividad enzimática permanecen constantes, $16.66 \text{ mmol min}^{-1} \text{ g cat}^{-1}$ y 0.06 U/mg lipasa , respectivamente.

Se asume que la acción de la disolución acuosa concentrada de NaOH debe actuar implementando la conformación más activa de la lipasa, pero en estudios previos no se pudo confirmar que sustituir la disolución de NaOH por otra disolución salina (disolución acuosa 2N de KH_2PO_4) que aportara fuerza iónica al entorno, aportara mayor eficiencia al proceso enzimático (Caballero et al., 2009; D. Luna et al., 2012; C. Verdugo et al., 2010).

En lo que respecta a la cantidad de lipasa empleada, de acuerdo con los resultados obtenidos con las diferentes reacciones recogidas en la **Tabla 3.2**, realizadas en condiciones estándar, pero variando la cantidad de lipasa, se puede comprobar que

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

la cantidad de lipasa empleada influye en la eficiencia de la reacción, alcanzando un máximo con 0.01 g de lipasa, como valor óptimo. Estos resultados coinciden básicamente con otros ya descritos, en los que sólo son necesarias cantidades mínimas para alcanzar el máximo rendimiento (Cristobal Verdugo et al., 2011). Esto se muestra gráficamente en la **Figura 4.3**.

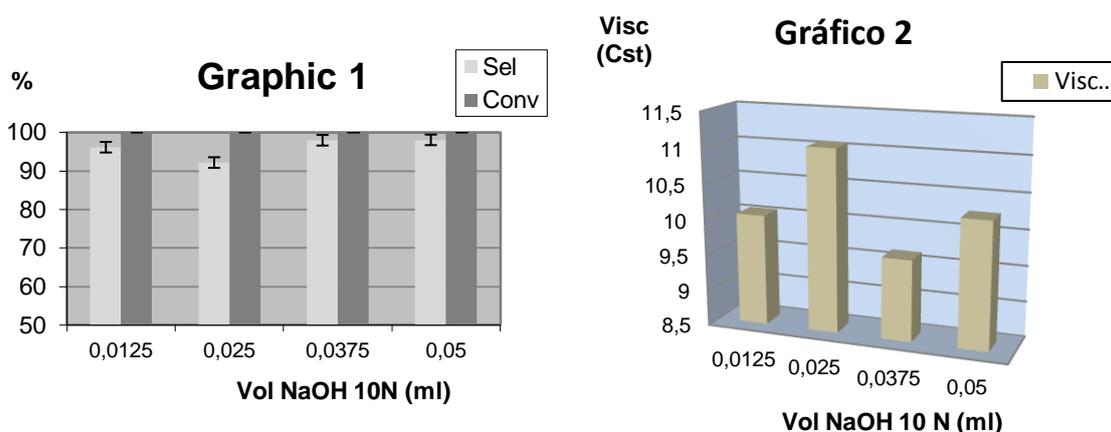


Figura 4.2. Influencia del volumen de disolución acuosa NaOH 10N en el rendimiento de la reacción de transesterificación llevada a cabo a 30 ° C durante 2 h, con 0,01 g de Lipopan, 6 ml de aceite de girasol comercial, 1,75 ml de etanol absoluto y diferentes volúmenes de disolución de NaOH 10N, con agitación mínima de 300 rpm. Conversión y selectividad (Gráfico 1), Viscosidad (Gráfico 2).

El efecto de la cantidad de lipasa se evaluó con el fin de utilizar sólo la cantidad necesaria de lipasa para maximizar el rendimiento, sin limitaciones de un efecto de transferencia de masa. El uso de elevadas cantidades de lipasa además de ser perjudicial para la economía del proceso, no aporta mejoría alguna en el rendimiento del proceso o en los valores de viscosidad, a pesar de emplear más cantidad de biocatalizador. Esto se puede comprobar muy bien mediante los valores del TOF y de la Actividad enzimática, que se ven afectados por la cantidad de catalizador aplicado.

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

De acuerdo con estos resultados, las condiciones óptimas para la realización de las reacciones de etanolisis, se consiguen al emplear la cantidad mínima eficaz de disolución acuosa de sosa y lipasa, 0.01 ml de NaOH 10 N y 0.01 g, respectivamente, con los volúmenes de reactivos indicados: 6 ml aceite de girasol, 1.75 ml de Etanol absoluto, operando a 30 °C con tiempos de reacción variables (2 a 24 h).

Por otra parte, es de destacar que operando con las condiciones óptimas seleccionadas, las conversiones son constantes a partir de 30 minutos de tiempo de reacción. Este corto tiempo de reacción es claramente competitivo, respecto a la reacción convencional alcalina, para obtener Ecodiésel en condiciones industriales. La presencia de aproximadamente un 30% en peso de MGs en el biocombustible aporta una influencia insignificante en los valores de viscosidad, que oscilan entre 9 y 11 cSt. La ausencia absoluta de glicerol en los productos de reacción obtenidos pone de manifiesto las posibilidades de esta ruta industrial biotecnológica para la producción de biocombustibles.

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

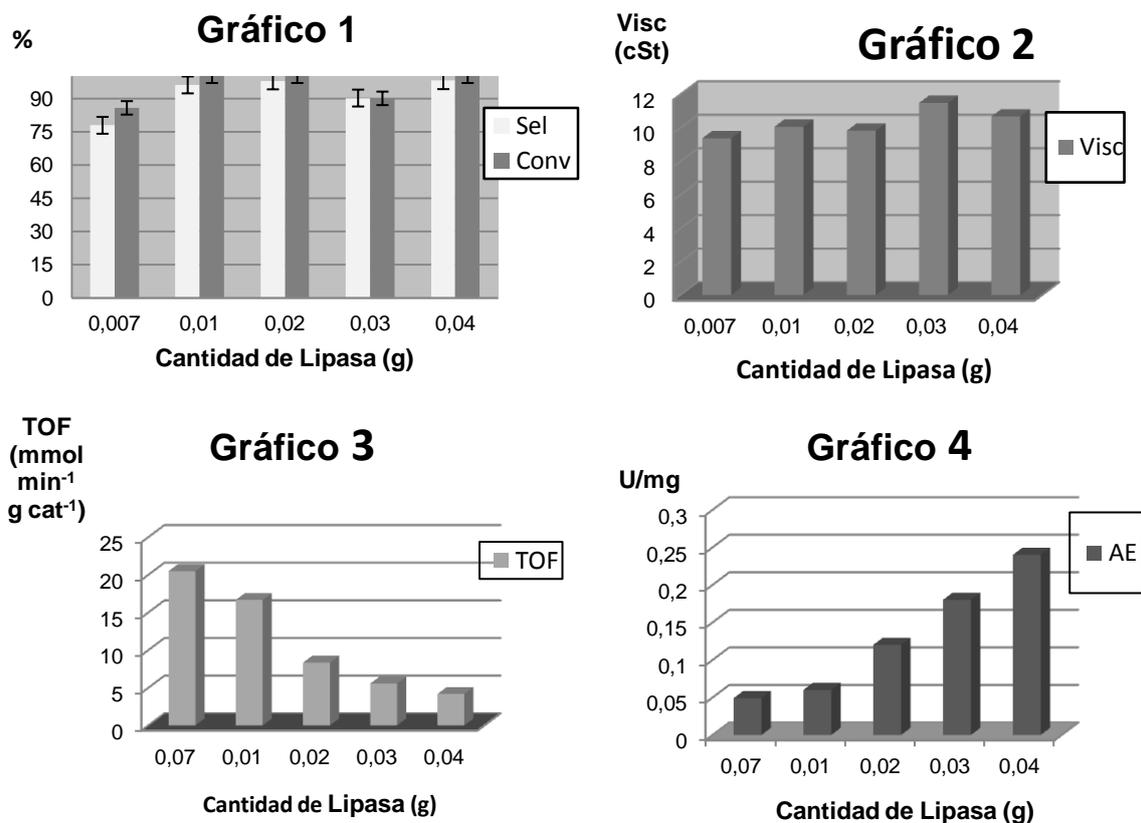


Figura 4.3. Influencia de la cantidad de lipasa en el rendimiento de la reacción de transesterificación selectiva realizada a 30 °C durante 2 h, con 0,0125 ml de disolución acuosa NaOH 10 N, 6 ml de aceite de girasol comercial, 1,75 ml de etanol absoluto y cantidades variables de Lipopan, agitación a 300 rpm. Conversión y selectividad (Gráfico 1), Viscosidad (Gráfico 2), TOF (Gráfico 3) y Unidades de actividad (Gráfico 4)

4.2. CALB. (Lipasa tipo B *Candida antarctica*).

En lo que respecta a la lipasa tipo B proveniente de la levadura *Candida antarctica* (CALB), aplicada en las diferentes formas estudiadas: inmovilizada comercial, libre purificada comercial, así como lipasa comercial inmovilizada en laboratorio, o en extractos enzimáticos lipásicos, obtenidos a partir de cultivos líquidos de cepas estándares de *C. antarctica*, provenientes de la CECT (Colección Española de Cultivos Tipo), hay que indicar que en todos los casos se obtienen resultados aceptables.

4.2.1. NOVOZYM 435 (N435).

Con el fin de evaluar la influencia de los parámetros cruciales (cantidad de lipasa, temperatura, relación volumétrica aceite/etanol y volumen de disolución de NaOH 10 N aplicado) en la reacción de transesterificación empleando esta lipasa inmovilizada comercial (Rivera, Villanueva, & Sandoval, 2009), se ha aplicado un diseño multi-factorial de experimentos con metodología de superficie de respuesta (RSM) (C. Luna, E. D. Sancho, et al., 2014; C. Luna, C. Verdugo, et al., 2014a; Cristobal Verdugo et al., 2011). Dicho diseño multifactorial de experimentos, que cuenta con tres factores, se obtiene aplicando la versión de software Stat Graphics "Centurion XVI.I".

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

a) ANÁLISIS DE LA VARIANZA (ANOVA) Y LA OPTIMIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS POR RSM.

A partir de los datos mostrados en la **Tabla 3.4** y mediante el software Statgraphics, se ha realizado un análisis estadístico multivariable (ANOVA) para determinar la correlación o "efectos" de las variables experimentales estudiadas con las variables de salida estudiadas (Conversión, Selectividad y Viscosidad cinemática). El software nos brinda diferentes salidas de datos que nos permiten analizar la influencia de las variables independientes en la variable dependiente en estudio.

Los resultados obtenidos con el diseño experimental factorial multinivel en el que se analiza la influencia de la temperatura, el pH y la relación aceite/alcohol, en el que se analizan los datos para diferentes variables de salida (variables independientes), como son conversión, contenido en FAEE y viscosidad cinemática, para tratar de establecer una correlación entre los valores obtenidos para estas variables y los parámetros de reacción estudiados (temperatura, relación aceite/etanol y volumen de disolución de NaOH 10 N) se muestran en los siguientes apartados.

I. RESULTADOS PARA CONVERSIÓN.

En la **Tabla 4.2.** se muestra la combinación de niveles de los factores que maximizan la conversión sobre la región indicada.

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Tabla 4.2. Respuesta optimizada de los factores que maximizan la conversión

Factor	Bajo	Elevado	Óptimo
Temperatura	-1.0	1.0	-0.17
Ratio	-1.0	1.0	-1.0
Volumen de disolución NaOH 10N	-1.0	1.0	-1.0

Valor óptimo: 100 %

En la **Figura 4.4**, se presenta el diagrama de Pareto, en el cual se puede observar claramente cuáles son los factores que influyen de manera estadísticamente significativa en la conversión. En este caso, la variable más influyente es la relación aceite/etanol, seguida de la temperatura y del volumen de disolución de NaOH 10 N, en orden decreciente de importancia. En este caso, el volumen de disolución de NaOH 10 N, no es un factor influyente para un nivel estadístico de confianza del 95 %. Es de destacar que tanto la relación aceite/etanol, la temperatura como el volumen de disolución de NaOH 10 N tienen una influencia positiva, de modo que al aumentar estas magnitudes se produce un aumento en la conversión.

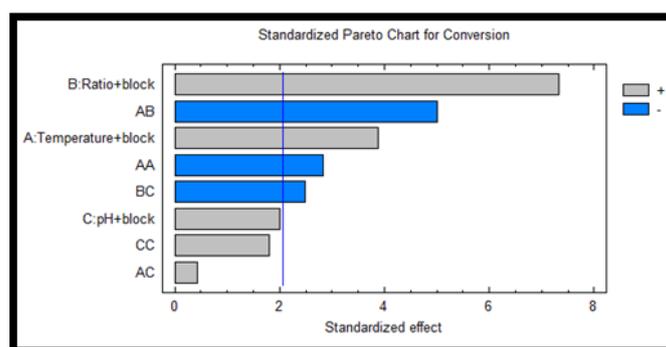


Figura 4.4. Gráfico de Pareto para la variable de salida Conversión.

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Pueden también observarse en la **Figura 4.5**, los efectos principales. En este gráfico se deduce fácilmente como una pendiente positiva indica un efecto positivo en la conversión, así como un mayor valor de la pendiente indica un efecto más acusado y viceversa. Por tanto se observa aquí y de manera complementaria a la **Figura 4.4**, como la relación aceite/etanol es el parámetro con mayor significancia estadística en la conversión.

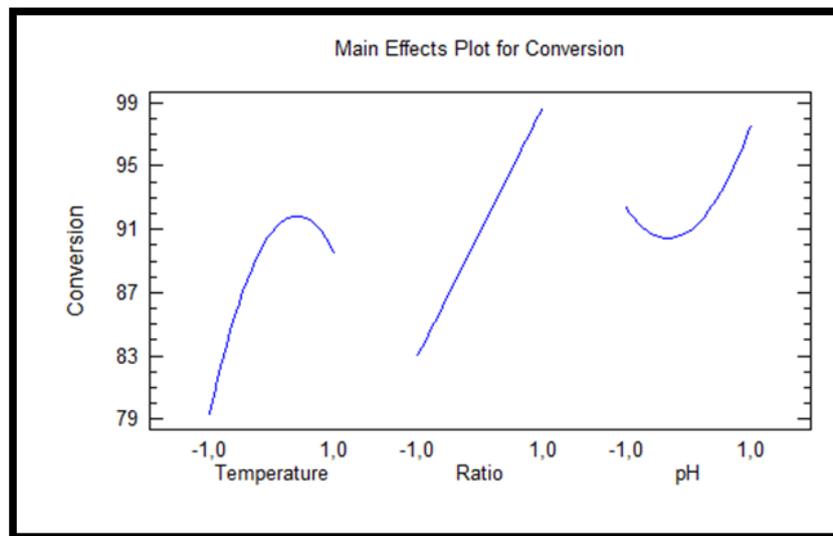


Figura 4.5. Gráfico de efectos principales para la variable de salida Conversión.

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

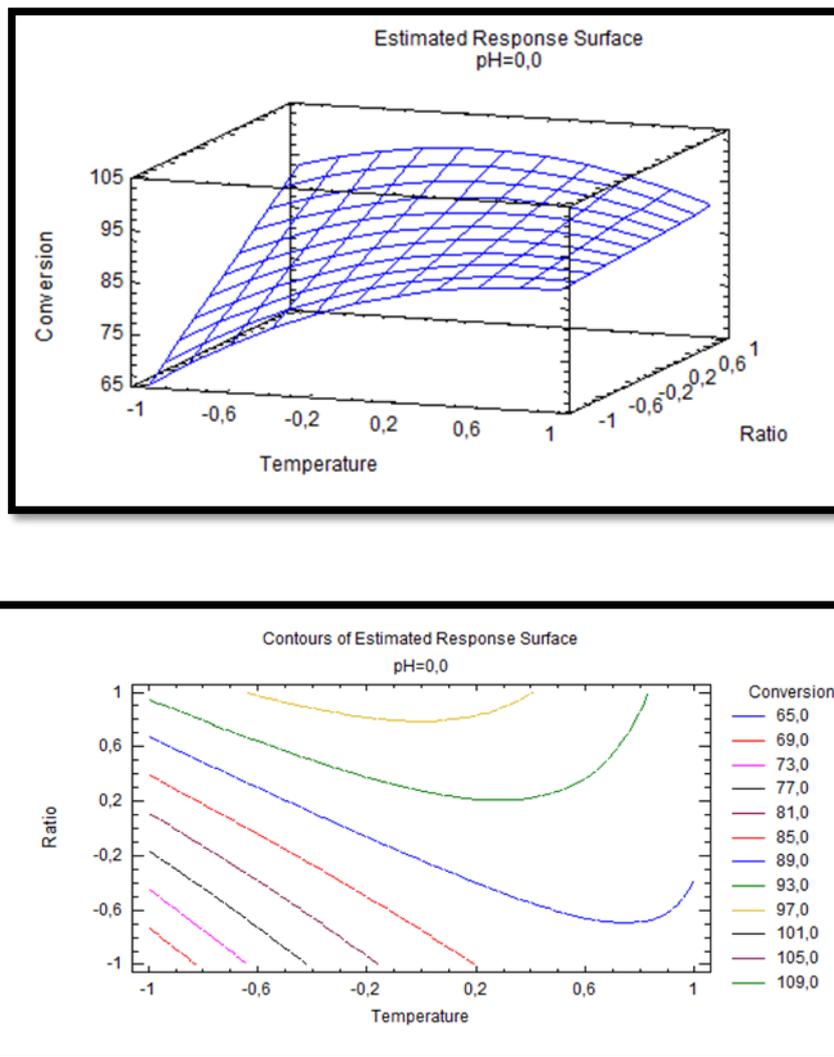


Figura 4.6. Superficies de respuesta para la variable de salida Conversión.

En la **Figura 4.6**, se muestran las superficies de respuesta obtenidas para el modelo estadístico creado para el sistema en estudio y para la variable de salida conversión. El ajuste del modelo es suficiente, con unos valores de R^2 del 81,62 % (cuando se obtienen unos valores de R^2 inferiores al 80 % se considera que no existe una correlación suficiente para poder utilizar el modelo propuesto), lo cual indica una

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

suficiente correlación entre los valores experimentales y predichos por el modelo creado, como puede verse en la **Figura 4.7**.

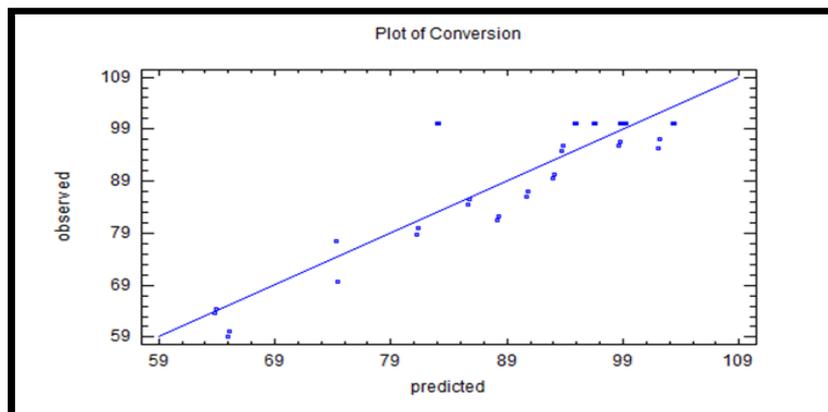


Figura 4.7. Gráfico de correlación entre valores experimentales y predichos por el modelo estadístico para la variable de salida Conversión.

La ecuación del modelo ajustado (**ecuación 4.1**) que se obtiene es la siguiente:

$$\begin{aligned} [Conversion (\%) = 90.8444 + 5.0833 \times T + 7.81944 \times R + \\ 2.60417 \times pH - 6.41667 \times T^2 - \\ 6.53333 \times T \times R + 0.675 \times T \times pH - 3.25 \times R \times pH + 4.09583 pH^2 \end{aligned} \quad (4.1)$$

T; Temperatura
pH; Volumen de disolución de NaOH 10N
R; Aceite/Etanol ratio

El modelo estadístico propuesto puede rehacerse, mejorando su poder predictivo, si se eliminan de éste las variables sin significación estadística en un intervalo de confianza del 95 %, y de esta manera se simplifica el proceso. Pero tras llevarlo a cabo se obtiene el nuevo análisis ANOVA con un R^2 menor, con un valor de

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

76.36 %, lo que indica un ajuste menor e insuficiente, explicando el 76.36 % de la variabilidad para la Conversión. Se obtienen unos valores de R^2 inferiores al 80 %, por lo que se considera que no existe una correlación suficiente para poder utilizar el modelo propuesto.

De todas formas, a pesar de no poder asumir formalmente la correlación obtenida, pero dado el elevado valor de R, muy próximo al 80% exigido, se muestra el gráfico de Pareto (**Figura 4.8.**), tras eliminar las variables estadísticamente no significativas, el modelo obtenido se simplifica sustancialmente, de modo que ahora sólo entran en juego la relación aceite/etanol, temperatura, y algunas de las relaciones de segundo orden existentes entre las tres variables (Temperatura-Ratio, Temperatura-Temperatura y Ratio-volumen de NaOH).

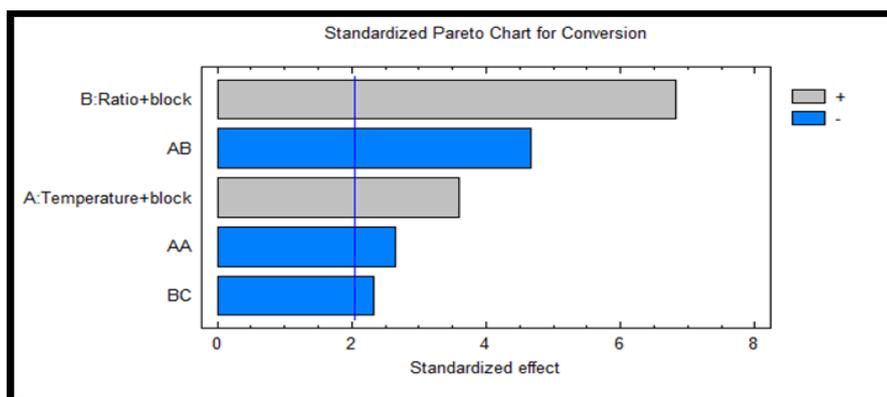


Figura 4.8. Gráfico de Pareto para la variable de salida Conversión del nuevo modelo ajustado (tras excluir variables no significativas).

En la **Figura 4.9** se muestra el gráfico de efectos principales donde, como es lógico, ahora no se observa línea para el volumen de NaOH, debido a que se ha eliminado del modelo.

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

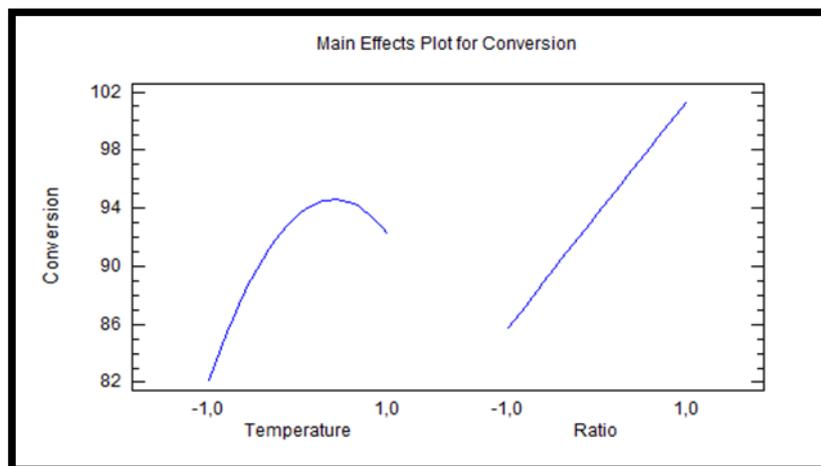


Figura 4.9. Gráfico de efectos principales para el modelo simplificado (tras excluir variables no significativas) y para la variable de salida Conversión.

En la **Figura 4.10** se muestra la nueva superficie de respuesta obtenida, aunque siguen siendo muy parecidas.

Dado que sólo se explicaría el 76,36 % de la variabilidad en la conversión, quizás no sería suficiente para poder utilizarse el modelo simplificado para describir el sistema, quedando la ecuación (**ecuación 4.2**) que lo describe como:

$$[Conversion (\%) = 93.57 + 5.06 \times T + 7.82 \times R - 6.42 \times T^2 - 6.53 \times T \times R - 3.25 \times R \times pH] \quad (4.2)$$

T; Temperatura.

pH; Volumen de disolución de NaOH 10N.

R; Aceite/Etanol ratio.

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Por tanto, puede concluirse que el modelo creado para correlacionar las variables de reacción con la conversión no es suficientemente aceptable, ya que no explicaría más del 80% de la variabilidad producida en la Conversión, pero sí presenta una elevada confianza.

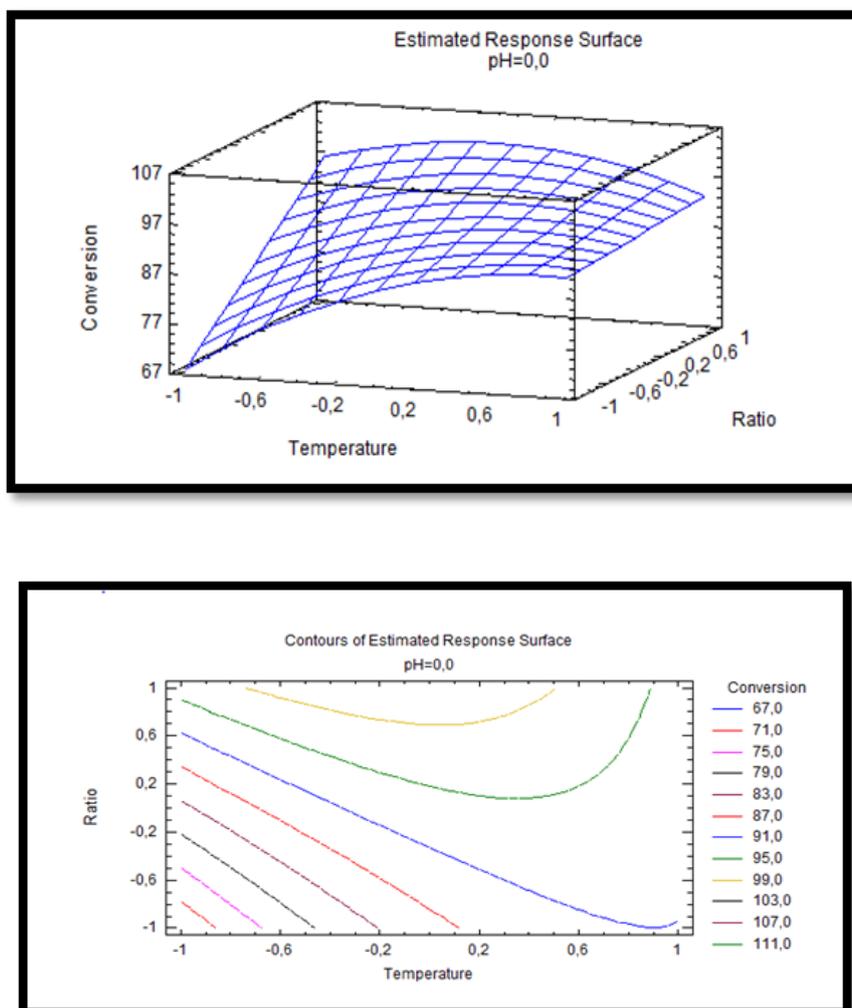


Figura 4.10. Superficies de respuesta del modelo simplificado (tras excluir variables no significativas) para la variable de salida Conversión.

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

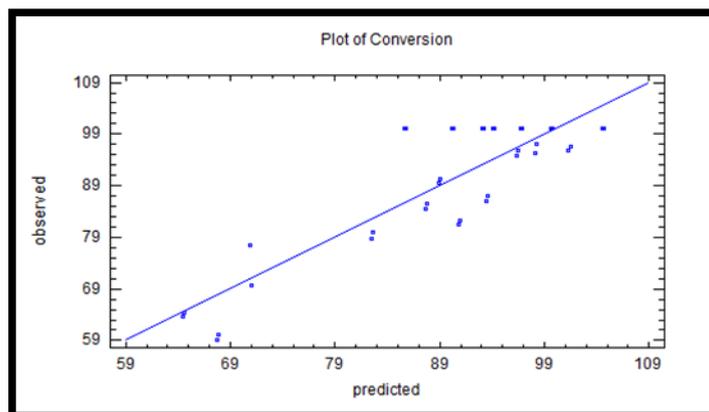


Figura 4.11. Gráfico de correlación entre valores experimentales y predichos por el modelo estadístico simplificado (tras excluir variables no significativas) para la variable de salida Conversión.

II. RESULTADOS PARA SELECTIVIDAD.

También se ha realizado un estudio de la influencia de la temperatura, volumen de disolución de NaOH 10 N y relación aceite/etanol en la Selectividad (contenido en FAEE+MG) de la mezcla final de reacción. Los resultados y discusión se resumen a continuación.

En la **tabla 4.3** se muestra la combinación de niveles de los factores que maximizan la conversión sobre la región indicada.

Tabla 4.3. Respuesta optimizada

Factor	Bajo	Elevado	Óptimo
Temperatura	-1.0	1.0	-1.0
Ratio	-1.0	1.0	-1.0
Volumen de disolución de NaOH 10N	-1.0	1.0	1.0

Valor óptimo: 69.24 %

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En la **Figura 4.12** se muestra el diagrama de Pareto para la variable de salida Selectividad (contenido en FAEE+MG). En este diagrama se observa que la Temperatura y la relación aceite/etanol y el volumen de disolución de NaOH 10 N son, en orden decreciente de importancia, los factores estadísticamente significativos en la Selectividad. Puede también observarse como la variable mayoritariamente influyente y de forma positiva es la temperatura y la relación aceite/etanol. Por tanto, un aumento de la relación aceite/etanol y de la temperatura sobre todo en el rango de estudio, producen un aumento en la Selectividad, es decir del contenido en FAEE y MG de la mezcla final.

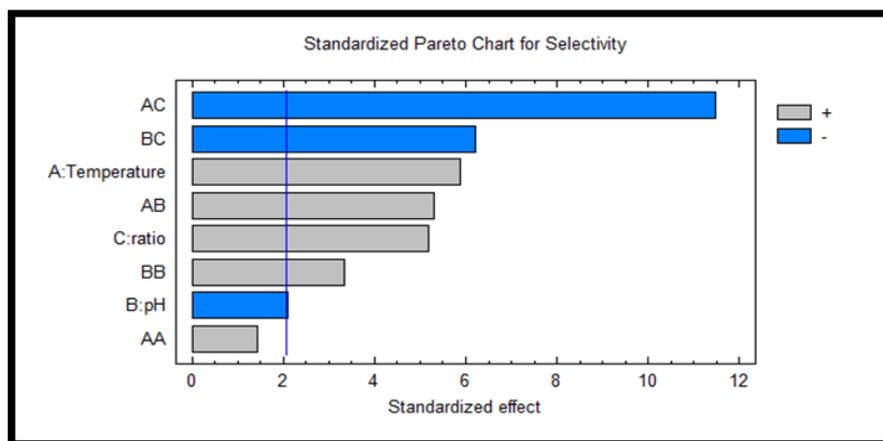


Figura 4.12. Gráfico de Pareto para la variable de salida Selectividad.

De la misma forma, en la **Figura 4.13**, se muestra el gráfico de efectos principales para la variable de salida Selectividad. Se observa en esta figura como tanto la temperatura como la relación aceite/etanol producen un efecto positivo en la Selectividad de la mezcla final de reacción. Además, se puede ver como este efecto para estas dos variables es bastante acusado, como puede deducirse de las elevadas pendientes mostradas para ambos efectos. En cambio, tal como se podía ver en el

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

anterior diagrama de Pareto, y como también puede deducirse de la figura de efectos principales, el efecto provocado por el pH volumen de NaOH en la Selectividad es variable (positivo o negativo) y mucho menos acusado.

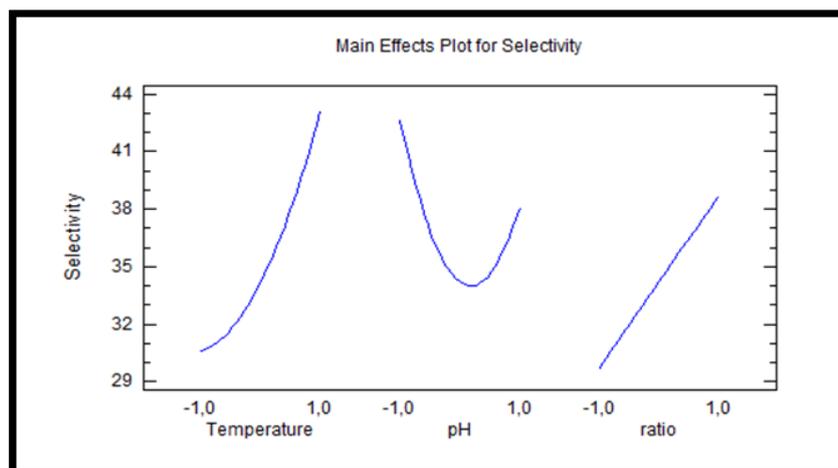


Figura 4.13. Gráfico de efectos principales para la variable de salida Selectividad.

En la **Figura 4.14** se muestran las superficies de respuestas obtenidas para el modelo estadístico y la variable de salida Selectividad. El modelo proporciona un buen ajuste, como se desprende del valor de R^2 de 91.42 %, lo cual es bastante bueno para tratarse de un sistema enzimático y relativamente complejo. Este valor de R^2 indica una buena correlación entre los valores experimentales y los proporcionados por la ecuación modelada, lo cual puede verse gráficamente en la **Figura 4.15**.

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

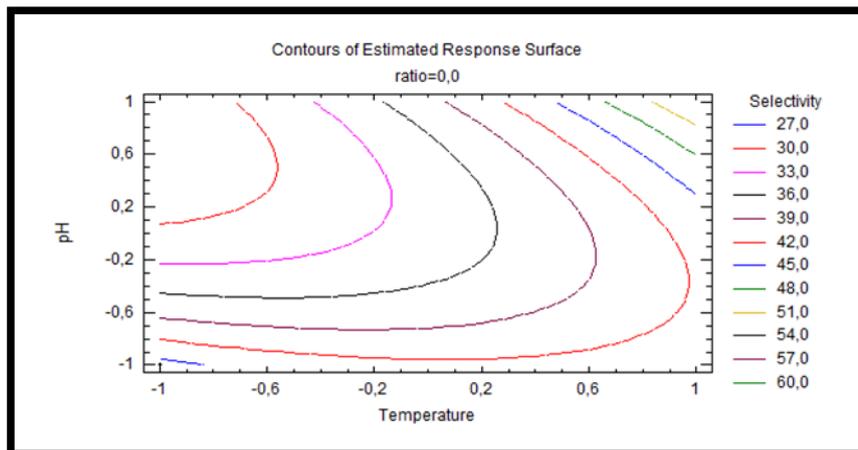
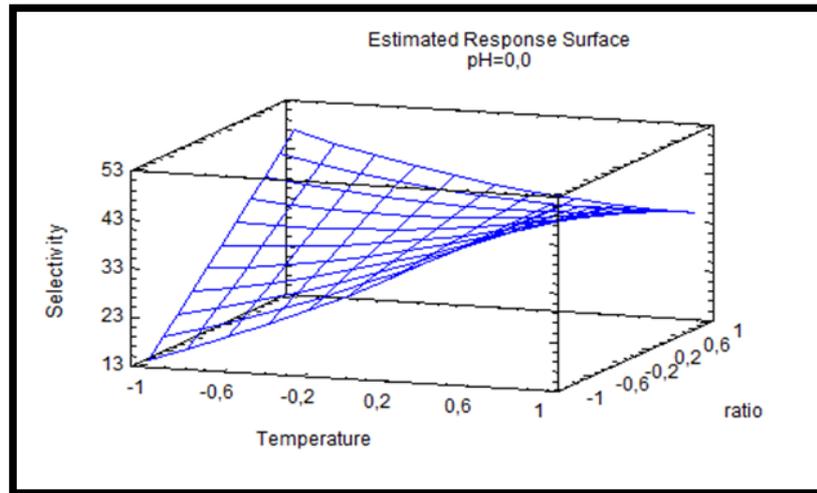


Figura 4.14. Superficies de respuestas para la variable de salida Selectividad.

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

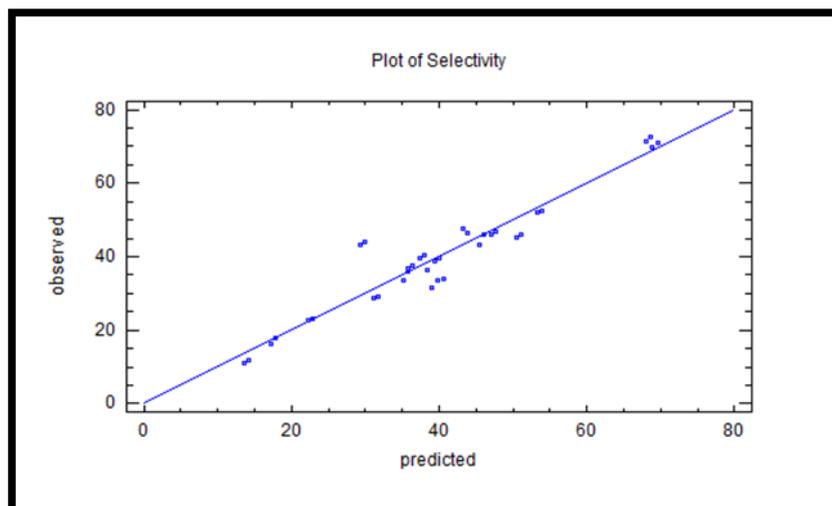


Figura 4.15. Gráfico de correlación entre valores experimentales y predichos por el modelo estadístico simplificado para la variable de salida conversión.

La ecuación resultante del modelo así ajustado (**Ecuación 4.3.**) se muestra a continuación:

$$[Selectivity (\%) = 34.2111 + 6.2625 \times T - 2.25 \times pH + 4.50278 \times R + 2.64583 \times T^2 + 6.93125 \times T \times pH - 12.2208 \times T \times R + 6.13333 \times pH^2 - 6.6 \times pH \times R + 6.6 \times R^2 - 6.6] \quad (4.3)$$

T; Temperatura
 pH; Volumen de disolución de NaOH 10N
 R; Aceite/Etanol ratio

Al igual que en el caso de la variable de salida Conversión, en éste caso también se pueden eliminar del modelo las variables estadísticamente no significativas, para de esa forma obtener un modelo aún más simplificado. Tras llevarlo a cabo se obtiene del nuevo análisis ANOVA con un R^2 algo menor y con un valor de 90.74 %, lo que indica

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

un ajuste algo menor, pero todavía suficiente y elevado, pues explica el 90.74 % de la variabilidad para la Selectividad.

Eliminando del modelo inicial las variables estadísticamente no significativas, el resultado no se traduce en una simplificación sustancial del modelo. En este caso todas las variables son estadísticamente significativas, o sea, Temperatura, relación aceite/etanol y el volumen de disolución de NaOH 10 N, además de las relaciones de segundo orden existentes entre las variables de reacción, sólo se excluiría la relación de segundo orden de la temperatura consigo misma (AA), como se visualiza en la **Figura 4.16**.

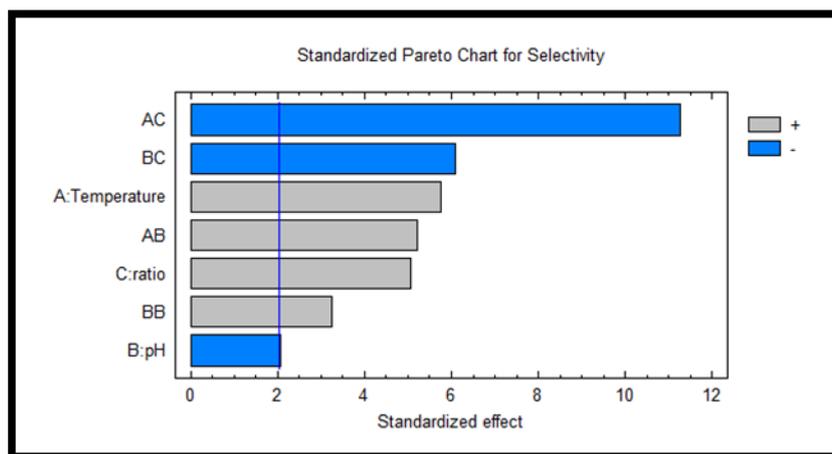


Figura 4.16. Gráfico de Pareto para la variable de salida Selectividad del nuevo modelo ajustado (tras excluir variables no significativas).

En la **Figura 4.17** se observa el gráfico de efectos principales para el nuevo modelo simplificado.

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

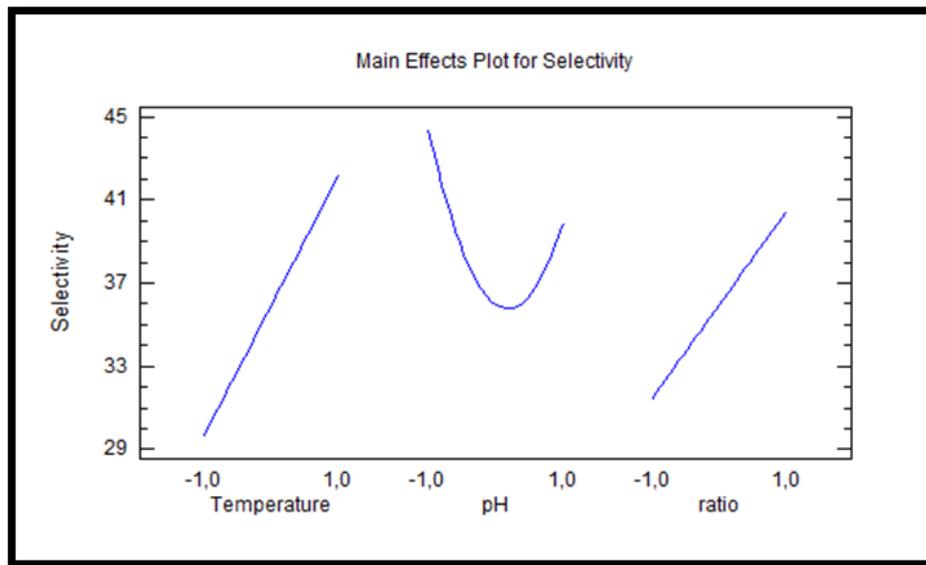


Figura 4.17. Gráfico de efectos principales para el modelo simplificado (tras excluir variables no significativas) y la variable de salida Selectividad.

En la **Figura 4.18** se muestra la gráfica de superficie de respuesta obtenida para el modelo simplificado y para las dos variables con mayor significación estadística.

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

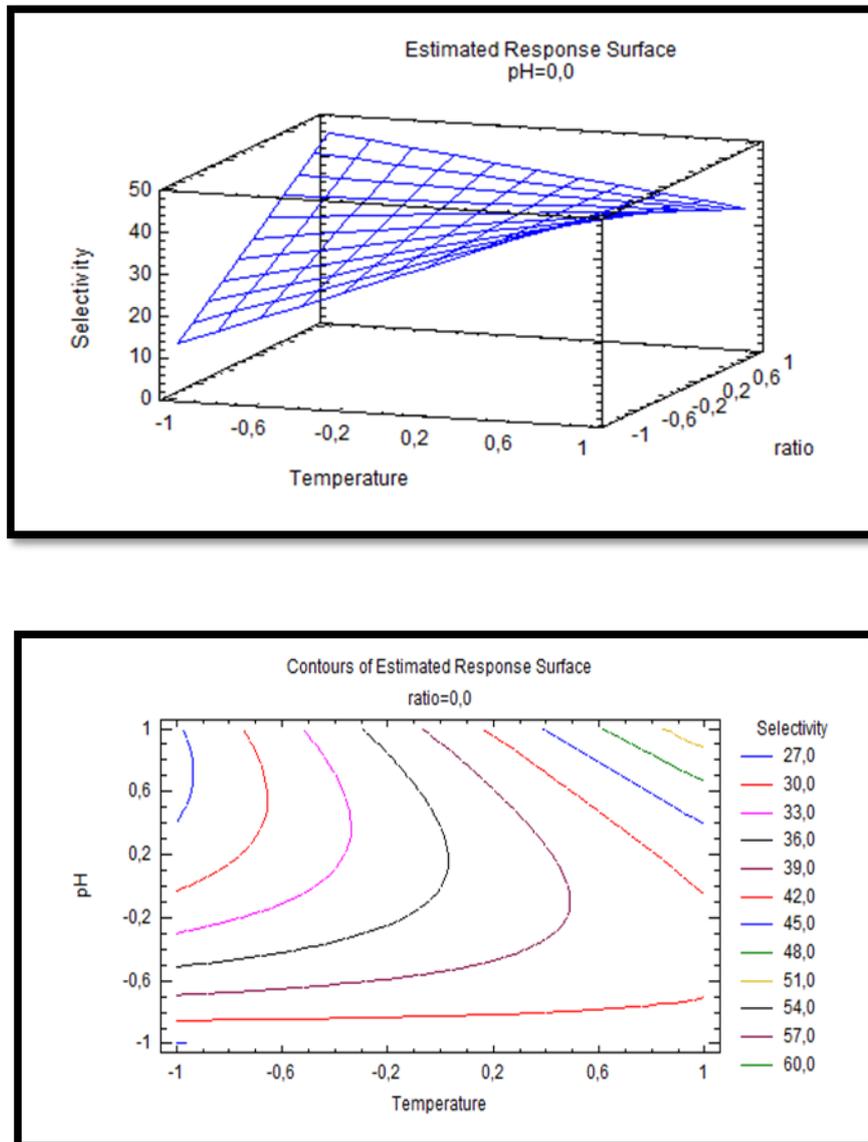


Figura 4.18. Superficies de respuesta del modelo simplificado (tras excluir variables no significativas) y para la variable de salida Selectividad.

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En este caso, como puede verse en la **Figura 4.19**, el modelo simplificado explica un 90.74 % de la variabilidad en la Selectividad, mientras que el modelo inicial no simplificado explica el 91.42 %, manteniéndose los errores estándares prácticamente iguales. Por tanto no habría una gran diferencia entre usar el modelo completo o simplificado, aunque es cierto que se obtienen resultados más precisos con el modelo completo.

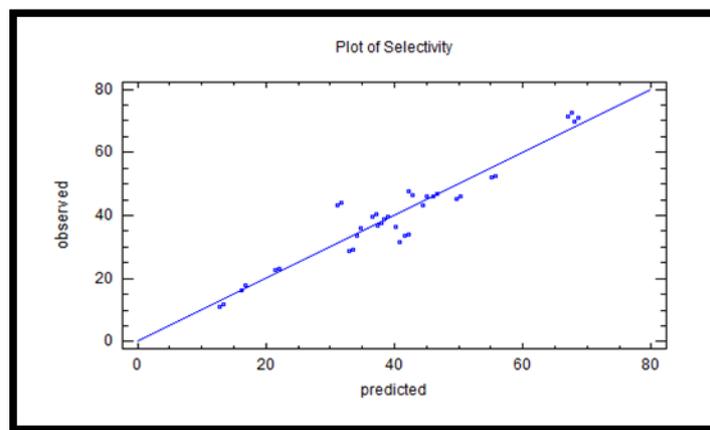


Figura 4.19. Gráfico de correlación entre valores experimentales y predichos por el modelo estadístico simplificado (tras excluir variables no significativas) para la variable de salida Selectividad.

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La ecuación (**ecuación 4.4.**) simplificada del nuevo modelo ajustado es:

$$[Selectivity (\%) = 35.97 + 6.26 \times T - 2.25 \times pH + 4.50 \times R + 6.93 \times T \times pH - 12.22 \times T \times R + 6.13 \times pH^2 - 6.61 \times pH \times R] \quad (4.4)$$

T; Temperatura

pH; Volumen de disolución NaOH 10N

R; Aceite/Etanol ratio

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

III. RESULTADOS PARA VISCOSIDAD CINEMÁTICA.

De forma similar, se ha llevado a cabo también un análisis de la influencia de los parámetros de reacción en la variable de salida Viscosidad cinemática. En la **Tabla 4.4** se muestra la combinación de niveles de los factores que maximizan la conversión sobre la región indicada.

Tabla 4.3. Respuesta optimizada

Factor	Bajo	Elevado	Óptimo
Temperatura	-1.0	1.0	-1.0
Ratio	-1.0	1.0	1.0
Volumen de disolución de NaOH 10 N	-1.0	1.0	-1.0

Valor óptimo: 10.60

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En la **Figura 4.20** se muestra el diagrama de Pareto para la variable de salida Viscosidad cinemática. En este diagrama se observa que la relación aceite/etanol y la Temperatura son, en orden decreciente de importancia, los factores estadísticamente significativos en esta variable de salida. Se puede ver de manera muy clara que la relación aceite/etanol es el factor estadístico de más peso, siendo además un efecto negativo, lo que indica, que un aumento de la relación aceite/etanol, o sea, un aumento del contenido en etanol (ya que inicialmente se ha considerado como valor clave 1, una relación 12/3.5 y como -1 una relación 12/2, lo que implica que al aumentar desde -1 a 1, se produce un aumento del contenido en etanol), provoca una disminución de la viscosidad cinemática.

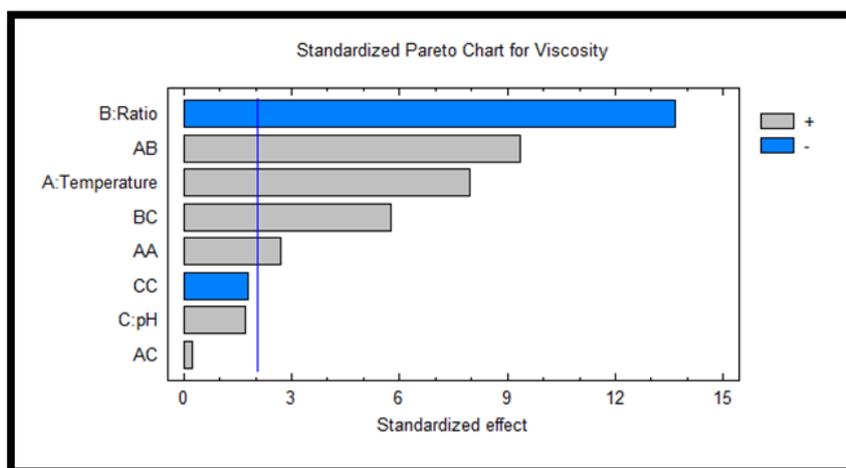


Figura 4.20. Gráfico de Pareto para la variable de salida Viscosidad cinemática.

En la **Figura 4.21**, se muestra el gráfico de efectos principales para la variable de salida Viscosidad. Se observa en esta figura como la temperatura producen un efecto positivo en la Viscosidad de la mezcla final de reacción, lo contrario sucede con la relación aceite/etanol.

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

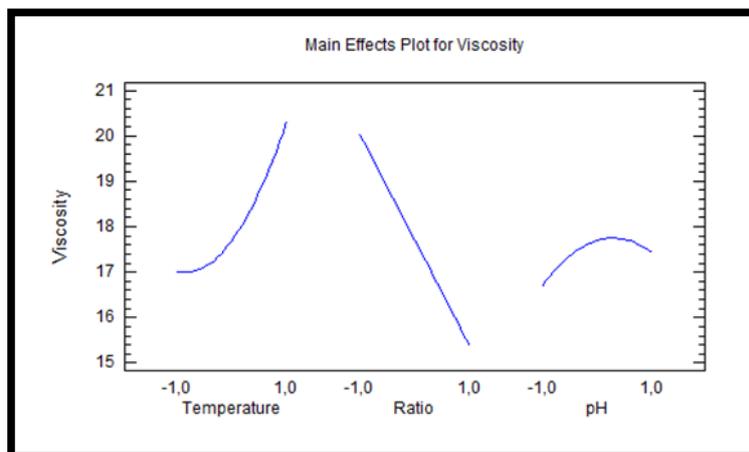


Figura 4.21. Gráfico de efectos principales para la variable de salida Viscosidad cinemática.

En la **Figura 4.22** se muestra la superficie de respuesta obtenida para el modelo estadístico y la variable de salida Selectividad. El modelo proporciona un buen ajuste, como se desprende del valor de R^2 de 93.67 %, lo cual es bastante bueno para tratarse de un sistema enzimático y relativamente complejo. Este valor de R^2 indica una buena correlación entre los valores experimentales y los proporcionados por la ecuación modelada, lo cual puede verse gráficamente en la **Figura 4.23**.

Al igual que en el caso de ambas variables de salida anteriores, en este caso también se pueden eliminar del modelo las variables estadísticamente no significativas, para de esa forma obtener un modelo aún más simplificado. Tras llevarlo a cabo se obtiene del nuevo análisis ANOVA con un R^2 algo menor y con un valor de 92.17 %, lo que indica un ajuste levemente menor, pero que aún sigue explicando el 92.17 % de la variabilidad para la Selectividad.

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Eliminando del modelo inicial las variables estadísticamente no significativas, el resultado se traduce en una simplificación sustancial del modelo. En este caso sólo la relación aceite/etanol y la Temperatura son estadísticamente significativas, además de algunas de las relaciones de segundo orden existentes entre las variables de reacción, como se visualiza en la **Figura 4.24**.

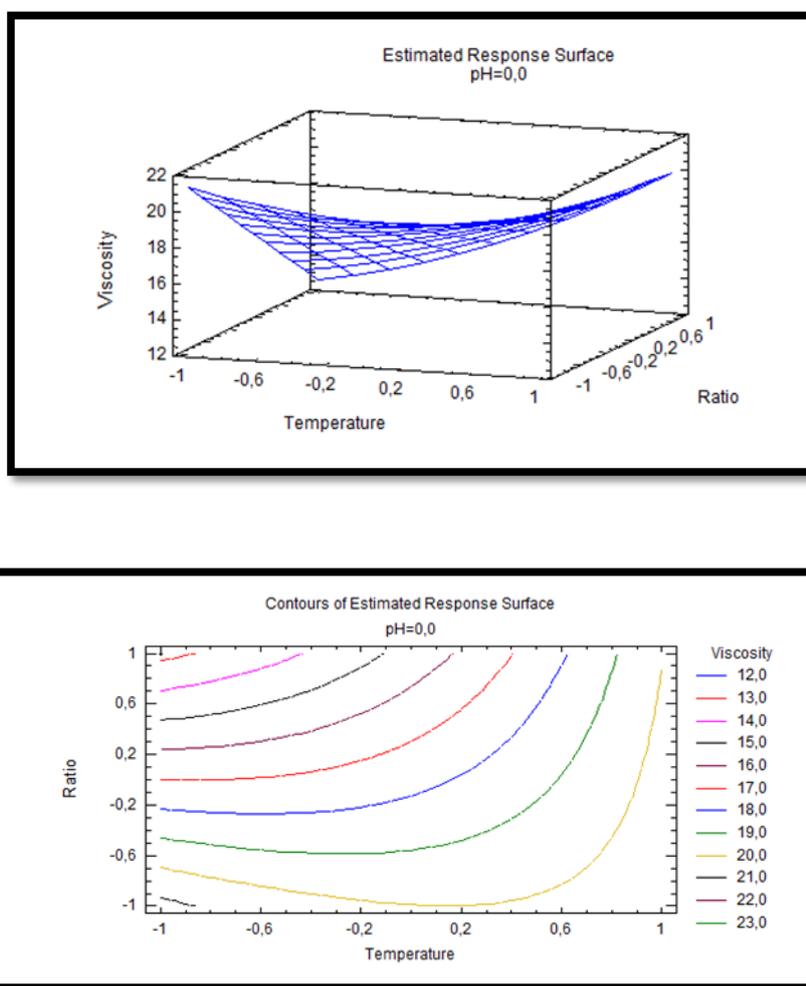


Figura 4.22. Superficies de respuesta para la variable de salida Viscosidad cinemática.

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

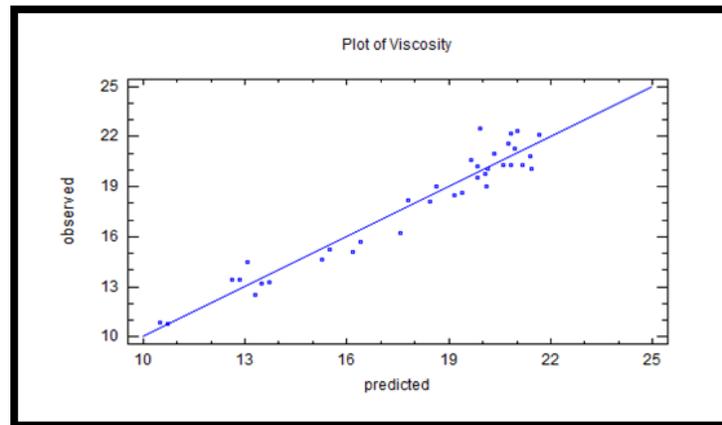


Figura 4.23. Gráfico de correlación entre valores experimentales y predichos por el modelo estadístico simplificado para la variable de salida Viscosidad cinemática.

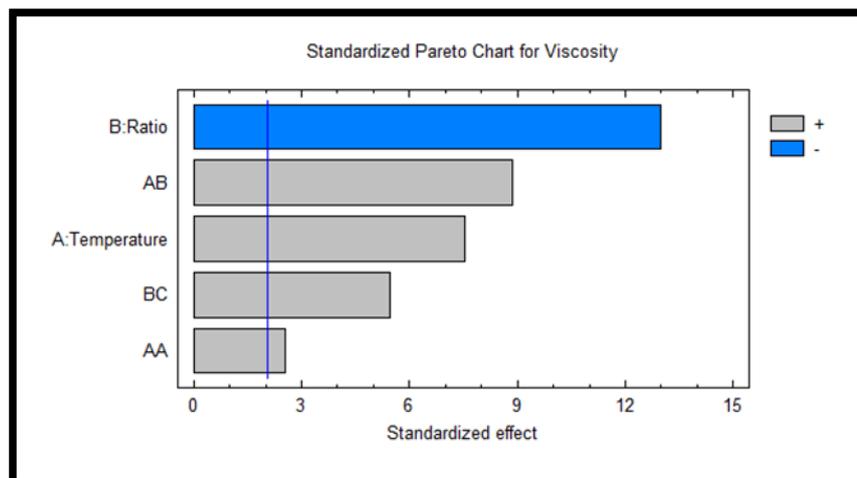


Figura 4.24. Gráfico de Pareto para la variable de salida Viscosidad cinemática del nuevo modelo ajustado (tras excluir variables no significativas).

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En la **Figura 4.25** se observa el gráfico de efectos principales para el nuevo modelo simplificado.

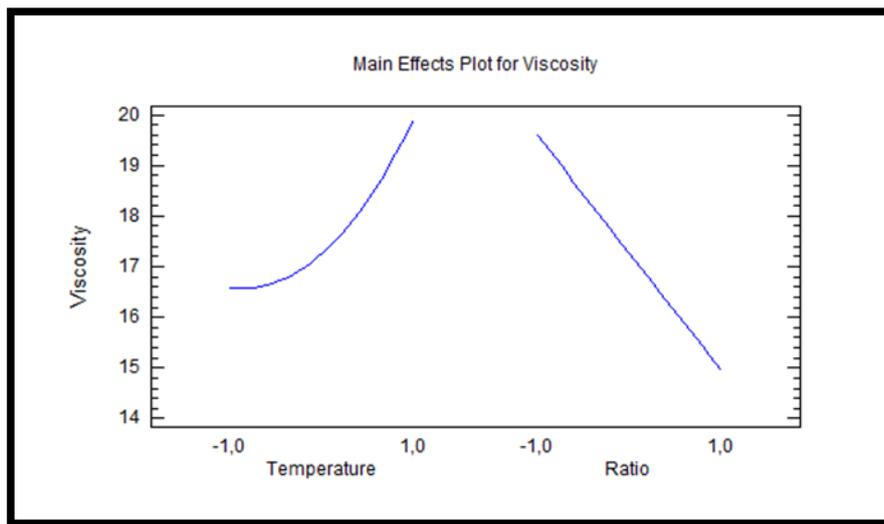


Figura 4.25. Gráfico de efectos principales para el modelo simplificado (tras excluir variables no significativas) y la variable de salida Selectividad.

En la **Figura 4.26** se muestra la gráfica de superficie de respuesta obtenida para el modelo simplificado y para las dos variables con mayor significación estadística.

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

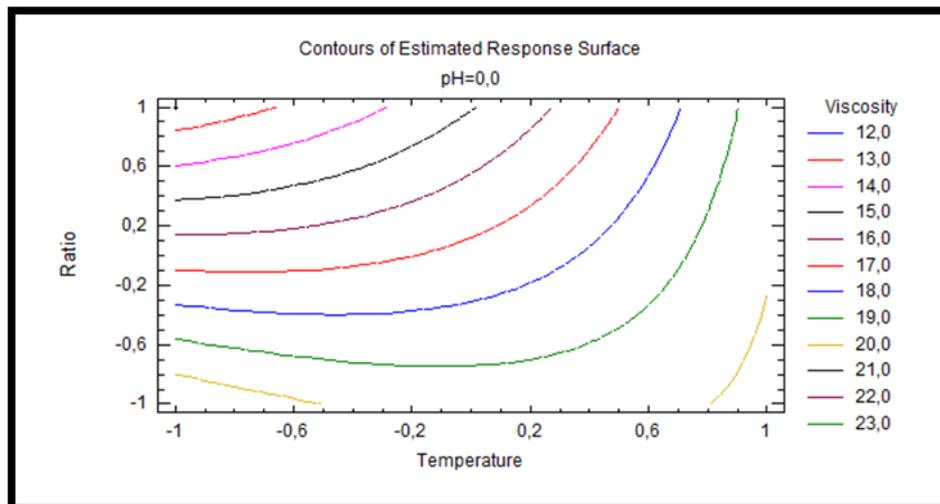
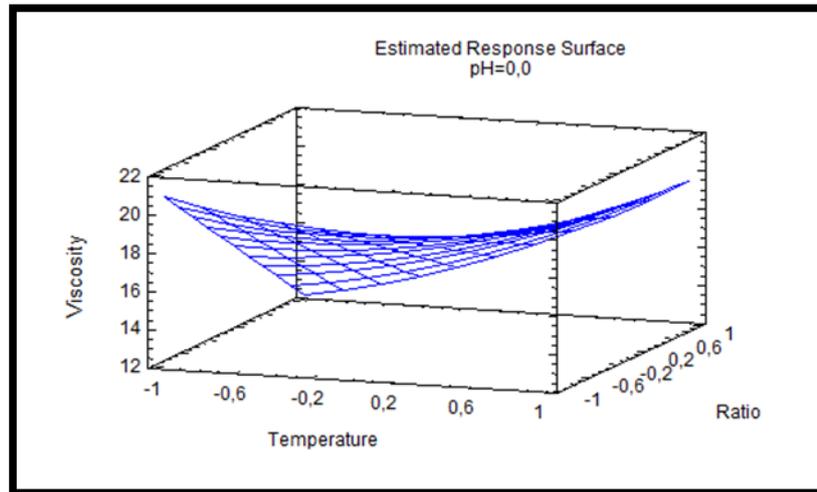


Figura 4.26. Superficie de respuesta del modelo simplificado (tras excluir variables no significativas) y para la variable de salida Viscosidad.

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La ecuación (**ecuación 4.5**) del modelo ajustado es:

$$\begin{aligned} & [Viscosity(cSt) \\ & = 17.7028 + 1.65417 \times T - 2.32222 \times R \\ & + 0.358333 \times pH + 0.970833 \times T^2 + 1.94583 \times T \\ & \times R + 0.05625 \times T \times pH + 1.20 \times R \times pH \\ & - 0.641667 \times pH^2] \end{aligned} \tag{4.5}$$

T; Temperatura
pH; Volumen de disolución NaOH 10 N
R; Aceite/Etanol ratio

En este caso y tal como se ha mencionado antes y como puede verse en la **Figura 4.27**, el modelo simplificado explica un 92.17 % de la variabilidad en la Selectividad, mientras que el modelo inicial no simplificado explica el 93.67 %, manteniéndose los errores estándares prácticamente iguales. Por tanto no habría una gran diferencia entre usar el modelo completo o simplificado, aunque es cierto que se obtienen resultados más precisos con el modelo completo.

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

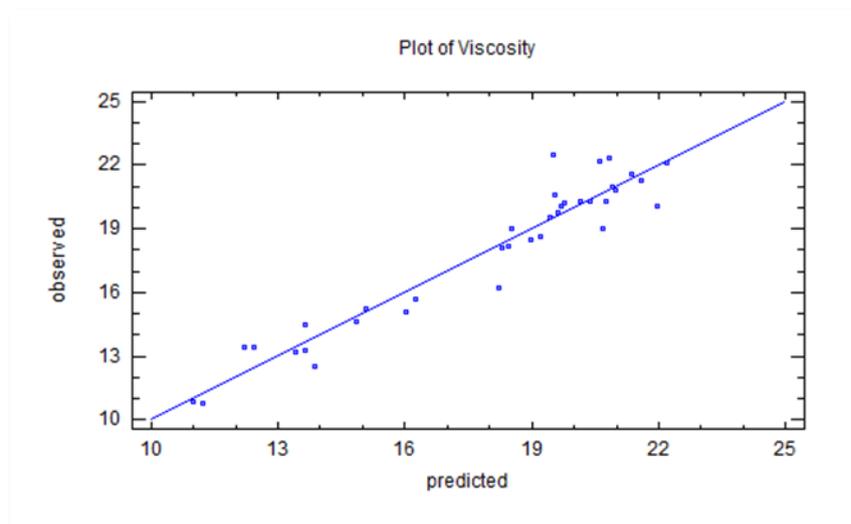


Figura 4.27. Gráfico de correlación entre valores experimentales y predichos por el modelo estadístico simplificado (tras excluir variables no significativas) para la variable de salida Viscosidad cinemática.

La ecuación simplificada (**ecuación 4.6**) del nuevo modelo ajustado es:

$$\begin{aligned} & [Viscosity(cSt) \\ & = 17.27 + 1.65 \times T - 2.32 \times R + 0.97 \times T^2 \\ & + 1.95 \times T \times R + 1.20 \times R \times pH] \end{aligned} \quad (4.6)$$

T; Temperatura
pH; Volumen de disolución de NaOH 10 N
R; Aceite/Etanol

Se puede observar cómo al eliminar del modelo las variables no significativas, el sistema queda descrito por una ecuación mucho más simple y que continúa explicando más del 90 % de la variabilidad producida en los experimentos.

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

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

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

b) EFECTO DE LA CANTIDAD DE LIPASA.

Este parámetro se evaluó con el fin de elegir la cantidad necesaria de lipasa que maximiza el rendimiento sin limitaciones de transferencia de masa. Se aplicarán los valores optimizados anteriores obtenidos por la RSM para las demás condiciones de reacción (12 ml de aceite / 3.5 ml de EtOH, 30 °C, 12,5 µl de disolución de NaOH 10 N, mayor agitación de 300 rpm, durante 2 h).

Se puede comprobar en la **Figura 4.28** la forma en que mejora el rendimiento y la viscosidad de reacción al aumentar el peso de biocatalizador empleado. En este caso se obtiene que, de forma continuada, al aumentar el peso de lipasa inmovilizada empleada. Se obtienen incrementos en el rendimiento del proceso enzimático. Este comportamiento es claramente diferente al obtenido con Lipopan 50 BG (**apartado 4.1**), con lipasa PPL (Caballero et al., 2009; C. Verdugo et al., 2010), con RM IM (Calero et al., 2014) o con Biolipasa R (C. Luna, C. Verdugo, et al., 2014a), en las que se obtiene un valor óptimo de peso de biocatalizador, es decir un máximo, a partir del cual pesos más elevados no sólo no aportan mejora alguna, sino que pueden rendir peores

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

conversiones. Sin embargo al emplear cantidades de enzima más elevadas se tendría un efecto perjudicial sobre la economía del proceso.

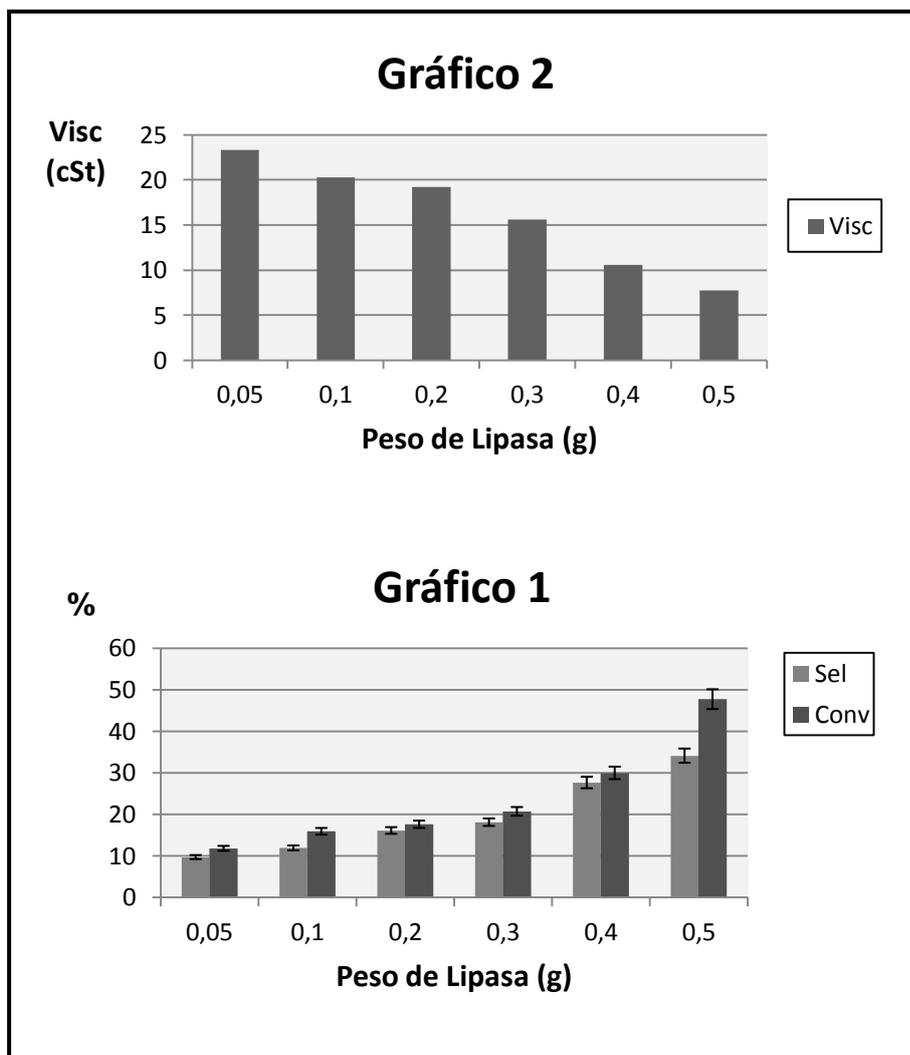


Figura 4.28. Influencia de la cantidad de biocatalizador (N435) en el rendimiento de las reacciones de etanolisis selectiva, realizada en condiciones estándar. Conversión y Selectividad (Gráfico 1) y Viscosidad cinemática en cSt (Gráfico 2).

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

c) ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DEL SISTEMA ENZIMÁTICO N435 EN REACCIONES SUCESIVAS.

Para la realización de este estudio se ha seguido la metodología OVAT ("Variable En One Time"), según la cual se establecen las condiciones iniciales y se han modificado las variables a estudiar una por una. Las reacciones con el sistema biocatalítico de lipasa N435 se han llevado a cabo en las condiciones óptimas (volumen de disolución NaOH 10N, temperatura y proporción relativa de aceite/etanol) previamente determinadas por los estudios de Superficie-Respuesta (RSM), anteriormente determinadas con la lipasa de *Thermomyces lanuginosus*, Lipopan 50 BG. En este sentido, a partir de la **Tabla 3.28** además de obtener información específica acerca de la influencia de ciertos parámetros (pH, temperatura, etc.) sobre el comportamiento de la N435, también se valora su capacidad para ser reutilizado.

Al subdividir los resultados de la **Tabla 3.28**, en función de la variable que se ha modificado cada vez en el estudio con la metodología OVAT, y organizamos estos resultados en sus correspondientes gráficos, según se expone en la **Figura 4.29**, donde se muestra claramente la influencia de cada variable en el rendimiento de la reacción de transesterificación. Estos resultados son similares a los obtenidos en el estudio ANOVA por RSM. Así, los parámetros de reacción óptimos para conseguir la etanolisis enzimática selectiva con lipasa N435, una lipasa B de *Candida antarctica* (CALB) inmovilizada en resina acrílica, son definitivamente: temperatura de reacción 30 °C, 12.5 µl de disolución acuosa NaOH 10 N, con 0.5 gramos de preparado enzimático para 12 mL de aceite y 3.5 mL de etanol absoluto (una relación molar 1:6 de aceite / etanol).

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

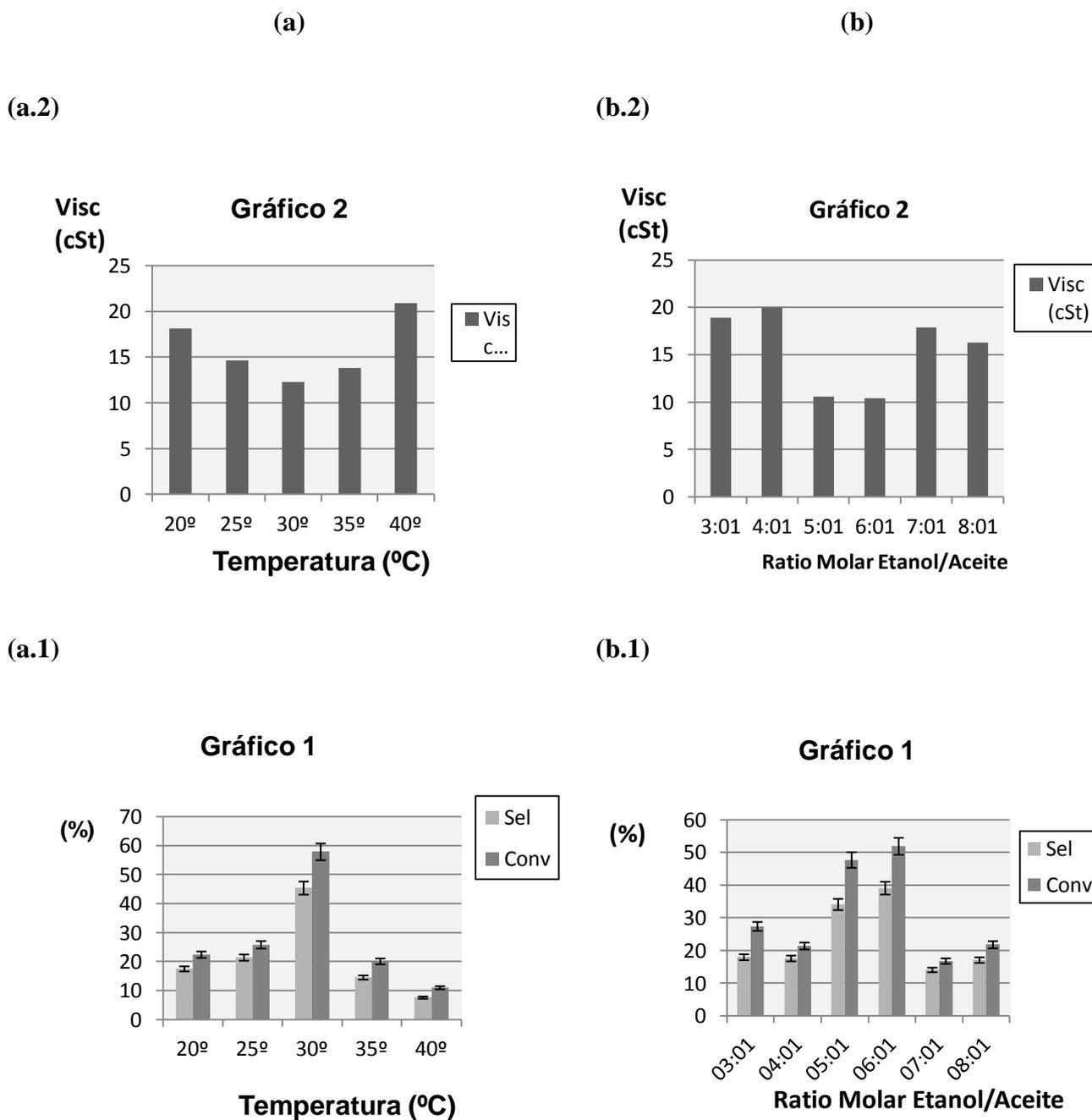


Figura 4.29. Influencia de la temperatura de reacción (a) y la relación molar aceite / etanol (b), en el rendimiento de la reacción enzimática de etanolisis efectuada con N435 (una lipasa CALB soportada en un polímero orgánico) efectuada condiciones estándar de reacción. Conversión y Selectividad (Gráfico 1) y Viscosidad en cSt (Gráfico 2).

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Asimismo, se puede comprobar a partir de los datos recogidos en la **Tabla 3.27**, que el biocatalizador N435 puede ser reutilizado repetidas veces. Así, como puede comprobarse en la **Figura 4.30**, dieciséis reacciones fueron desarrolladas sucesivamente sin una apreciable disminución en la actividad catalítica de la reacción de etanolisis de aceite de girasol. Sin embargo, debido a su carácter polimérico (acrílico), para poder recuperar el biocatalizador, una lipasa inmovilizada en una resina macroporosa, después de cada reacción sucesiva, se hace necesario llevar a cabo la centrifugación de los productos de reacción, lo que constituye un serio inconveniente para su aplicación comercial.

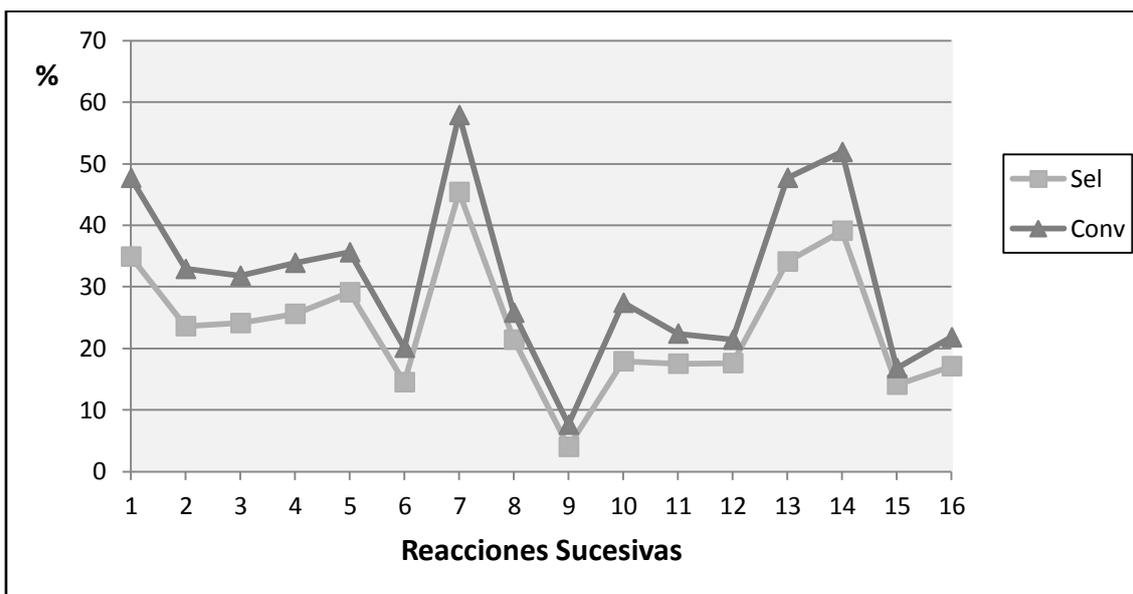


Figura 4.30. Rendimiento de la etanolisis enzimática (conversión y selectividad) obtenido en reacciones sucesivas realizadas mediante reutilizaciones ("reusos") del biocatalizador N435, operando bajo las condiciones estándar de reacción.

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

d) DISCUSIÓN GENERAL.

De acuerdo con los resultados aquí obtenidos al emplear la lipasa N435, una lipasa B de *Candida antarctica* (CALB) inmovilizada en resina acrílica, son similares a los descritos con las lipasas PPL comerciales (Caballero et al., 2009; C. Luna et al., 2013; D. Luna et al., 2012; C. Verdugo et al., 2010); con una lipasa purificada de bajo costo, de *Thermomyces lanuginosus*, Lipopan 50 BG (Novozymes AS, Dinamarca), ampliamente utilizada en la industria de panadería como un emulsionante (C. Luna, E. D. Sancho, et al., 2014; Cristobal Verdugo et al., 2011); con la lipasa comercial Biolipasa R, una lipasa de *Rhizopus oryzae* (C. Luna, C. Verdugo, et al., 2014a, 2014b); o Lipozyme RM IM, una lipasa inmovilizada comercial de *Rhizomucor miehei* (Calero et al., 2014).

En todos estos casos, se explora la posibilidad de aplicación de lipasas inmovilizadas comerciales en el proceso de etanolisis selectiva, tratando de aprovechar la oportunidad de su reutilización, lo que disminuye su costo operativo y en consecuencia aumenta el potencial económico para su aplicación industrial. El comportamiento de la lipasa soportada comercial, Novozym 435, puede implicar algunas ventajas tecnológicas respecto al resto de las lipasas comerciales investigadas hasta ahora, pero también inconvenientes importantes, tales como su relativo elevado costo, y la necesidad de centrifugar para su recuperación. En general, mediante la utilización de cualquiera de las lipasas comerciales investigadas es posible

La obtención de procesos de etanolisis 1,3 selectivos, donde el glicerol se mantiene como MG en la mezcla de biocombustible, con los diferentes FAEEs obtenidos y junto al exceso de etanol sin reaccionar. De esta manera, se consigue un nuevo tipo de biodiésel, actualmente denominado Ecodiésel, constituido por una mezcla de monoacilgliceroles y FAEEs principalmente (nominalmente 1/2), que se puede utilizar en diferentes mezclas con combustible diésel, sin más separación o proceso de purificación. Este nuevo biocombustible se puede conseguir con la ayuda

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

del biocatalizador N435 en tiempos de reacción muy cortos (1-2 h) y en condiciones de reacción suaves. Además, no sólo se consigue un rendimiento atómico más elevado, respecto a la reacción de producción de biodiésel convencional (porque no se genera glicerol como subproducto). Además, no es necesaria una etapa de purificación del glicerol residual, de modo que se pueda utilizar directamente después de su producción.

4.2.2. CALB INMOVILIZADA EN FORMA NO COVALENTE (mediante adsorción física).

Dado los inconvenientes observados con los soportes orgánicos al operar en un medio orgánico y lipófilos, como sucede en la reacción de transesterificación (necesidad de centrifugación de la lipasa N435), en esta investigación se ha evaluado el comportamiento de la misma lipasa CALB inmovilizada en un soporte inorgánico, concretamente en materiales Mesoporosos Organosilíceos Ordenados (PMO) y sobre material silíceo amorfo MS-3030 funcionalizado con grupos octilo organosilícicos anclados a la superficie del soporte. Tras la síntesis de estos sistemas biocatalíticos se ha procedido a la determinación del rendimiento y su evolución a lo largo del tiempo, en la reacción de transesterificación de aceite de girasol con etanol para obtener Ecodiésel (FAEE + MG). También se ha comprobado la vigorosidad y estabilidad del sistema biocatalítico, al efectuarse varios ciclos de reacción sucesivos.

a) ESTUDIO DEL RENDIMIENTO DE REACCIÓN.

Tras aplicar las condiciones estándar de reacción, comprobadas con otros sistemas enzimáticos, (6 ml aceite/ 1.75 ml EtOH, 30°C, 25 µL NaOH 10 N, agitación mayor de 300 rpm, durante 10 h de reacción) (C. Luna, C. Verdugo, et al., 2014a; C. Luna, C. Verdugo, et al., 2014c; Cristobal Verdugo et al., 2011), se obtienen los resultados recogidos en la **Tabla 3.29** y que se muestran en la **Figura 4.31**. Se aplican 0.1 g de CALB/PMO y 0.05 g de CALB/MS para conseguir, de forma aproximada, la misma carga enzimática que en los otros sistemas biocatalíticos ensayados en otros

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

procesos enzimáticos ya investigados, 0.01 g de sistema catalítico (Blanco, Terreros, Fernandez-Perez, Otero, & Diaz-Gonzalez, 2004; Gascon, 2014).

Se obtienen resultados muy aceptables, sobre todo en el caso de la CALB inmovilizada en el soporte de material silíceo amorfo MS-3030 funcionalizado con grupos octilo anclados en la superficie inorgánica del soporte.

En lo que respecta a la evolución del rendimiento a lo largo del tiempo de reacción, se muestran los resultados en la siguiente **Figura 4.32**. Podemos comprobar cómo la Conversión máxima se consigue en ambos casos con tiempos de reacción del orden de las 3-4 horas. Esto es un aspecto positivo del sistema biocatalítico a tener en cuenta para estimar su viabilidad a nivel industrial, donde es fundamental contar con biocatalizadores capaces de conseguir rendimientos elevados a tiempos de reacción breves. En este sentido es de destacar que estos tiempos son superiores a los conseguidos con los sistemas N435, Lipopan 50 BG y diversos extractos enzimáticos que alcanzan valores óptimos tan sólo a 2 horas de funcionamiento.

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

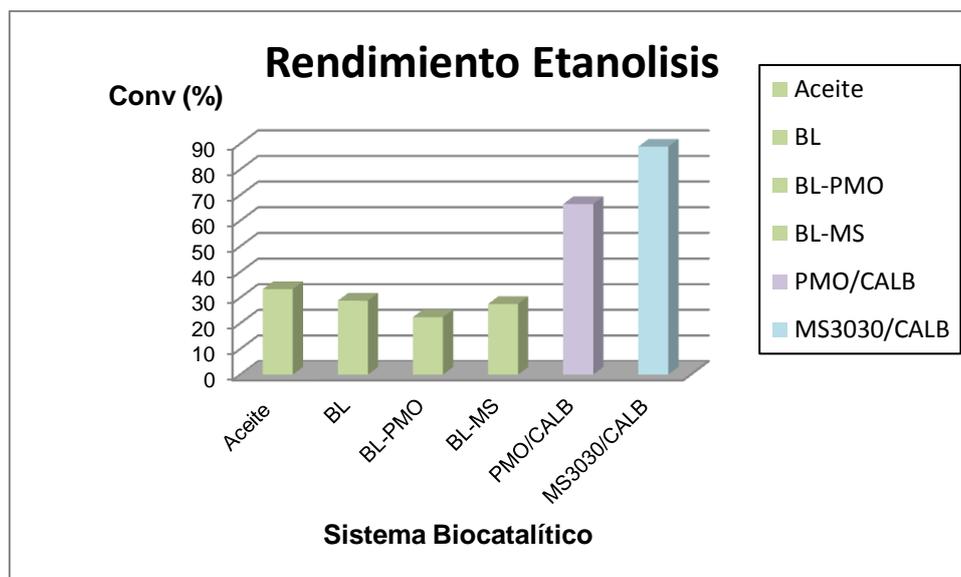


Figura 4.31. Rendimiento de la reacción de transesterificación selectiva realizada bajo las mismas condiciones de reacción estándar: 6 ml aceite, 1.75 ml EtOH, 30°C, 25 μ L de disolución acuosa NaOH 10 N, agitación mayor de 300 rpm, durante 10 h. empleando 0.1 g de CALB/PMO y 0.05 g de CALB/MS303030. Se adjuntan los valores de Conversión que presentan las reacciones realizadas sin carga enzimática, en blanco (BL) o en blanco con el soporte empleado (BL_PM0 y BL-MS).

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

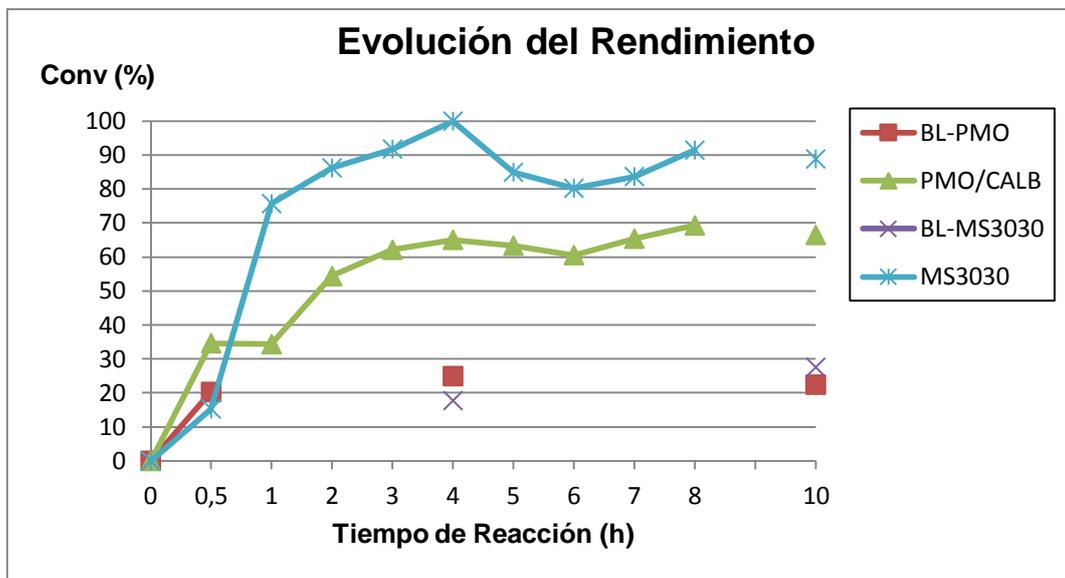


Figura 4.32. Evolución del rendimiento de la reacción de transesterificación selectiva operando bajo condiciones de reacción estándar: 6 ml aceite, 1.75 ml EtOH, 30°C, 25 μ L de disolución acuosa NaOH 10 N, agitación mayor de 300 rpm, durante 10 h. Aplicando los sistemas biocatalíticos 0.1 g de CALB/PMO y 0.05 g de CALB/MS.

b) ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DEL SISTEMA ENZIMÁTICO EN REACCIONES SUCESIVAS.

También es esencial que los biocatalizadores presenten un elevado nivel de robustez y estabilidad, que les permitan ser aplicados durante varios ciclos de reacción. Los resultados obtenidos con los ensayos de reutilización de ambos biocatalizadores se muestran en la **Figura 4.33**, donde se representan los resultados obtenidos operando bajo idénticas condiciones experimentales, reacciones sucesivas con el mismo sistema biocatalítico, para comprobar su estabilidad y vigorosidad. Los tiempos de reacción aplicados son de 3 h, dado que es el tiempo al que se alcanzan los niveles óptimos de rendimiento, según se recoge en la **Figura 4.32**.

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

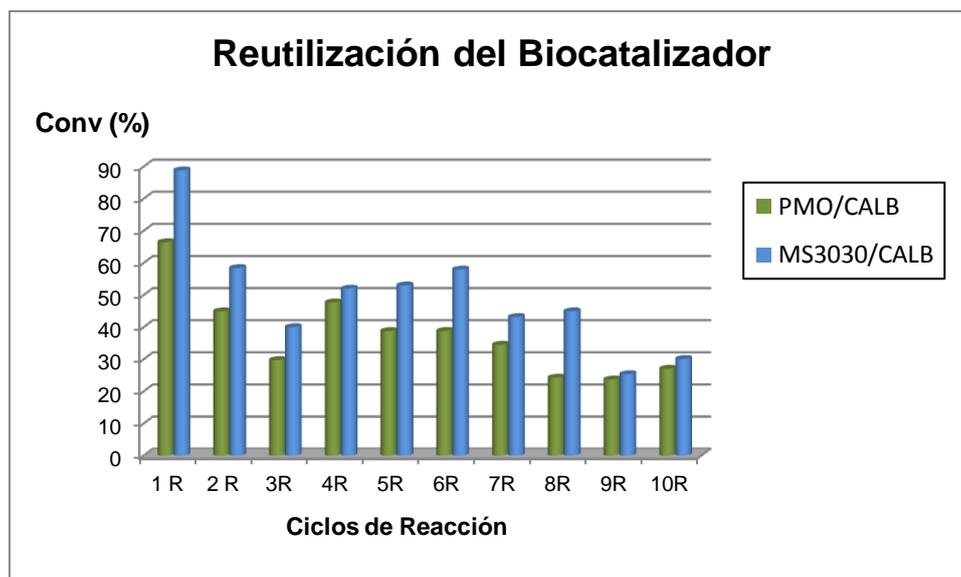


Figura 4.33. Rendimiento de la reacción de transesterificación selectiva obtenida en sucesivas reutilizaciones del mismo sistema biocatalítico, operando bajo condiciones de reacción estándar: 6 ml de aceite, 1.75 ml de EtOH, 30°C, 25 μ L NaOH de disolución acuosa 10 N, agitación mayor de 300 rpm, durante 3 h. 0.1 g de CALB/PMO y 0.05 g de CALB/MS.

c) DISCUSIÓN GENERAL.

De acuerdo a los resultados obtenidos, podemos afirmar que estos sistemas biocatalíticos obtenidos mediante inmovilización de una lipasa CALB comercial en 2 soportes inorgánicos, son candidatos viables para desarrollar, optimizar y mejorar una nueva metodología para conseguir integrar el glicerol como diferentes moléculas de monoacilglicerol junto con FAEE, en la reacción etanolisis selectiva de triglicéridos, para obtener Ecodiésel.

Estos resultados, así como los ya descritos en apartados anteriores (*Thermomyces lanuginosus*, Lipopan 50 BG y N435, una CALB inmovilizada comercial), son comparables a los descritos con otros sistemas biocatalíticos estudiados con anterioridad, como lipasas PPL comerciales (Caballero et al., 2009; C. Luna et al., 2013;

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

D. Luna et al., 2012; C. Verdugo et al., 2010), con *Thermomyces lanuginosus*, Lipopan 50 BG (Novozymes AS, Dinamarca), una lipasa purificada de bajo costo, utilizada en la industria de panadería como un emulsionante (C. Luna, E. D. Sancho, et al., 2014; Cristobal Verdugo et al., 2011), con la lipasa comercial Biolipasa R, una lipasa de *Rhizopus oryzae* (C. Luna, C. Verdugo, et al., 2014a, 2014b) , con Lipozyme RM IM, una lipasa inmovilizada comercial de *Rhizomucor miehei* (Calero et al., 2014).

En todos estos estudios se explora la posibilidad de aplicación de lipasas comerciales inmovilizadas en este proceso, tratando de aprovechar la oportunidad de su reutilización, lo que se supone disminuiría su costo operativo y en consecuencia aumentar el potencial económico de su biotecnológica en la producción enzimática de biocombustibles. Por lo tanto, en este estudio se determina el comportamiento de una lipasa comercial (CALB) inmovilizada en soportes inorgánicos, concretamente en materiales Mesoporosos Organosilíceos Ordenados (PMO) y sobre material silíceo amorfo MS-3030 funcionalizado con grupos octilo anclados, porque esto puede implicar algunas ventajas tecnológicas en su desarrollo. Así, este estudio tiene el objetivo de demostrar su viabilidad, su rendimiento y su posibilidad de reutilización, lo que significará un importante avance en sus aplicaciones biotecnológicas en la producción enzimática de biocombustibles (Calero et al., 2015; D. Luna et al., 2014) .

Los resultados obtenidos en este estudio, indican que esta lipasa comercial CALB inmovilizada en soportes inorgánicos se muestra viable y eficaz en la obtención de procesos de etanolisis 1,3 selectivos, donde el glicerol se mantiene como MG en la mezcla de biocombustible, con los diferentes FAEEs obtenidos y junto al exceso de etanol sin reaccionar. De esta manera, se consigue un nuevo tipo de biodiésel, actualmente denominado Ecodiésel, constituido por una mezcla de monoacilgliceroles y FAEEs principalmente (nominalmente 1/2), que se puede utilizar en diferentes mezclas con combustible diésel, sin más separación o proceso de purificación. Este

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

nuevo biocombustible se puede conseguir con la ayuda del biocatalizador N435 en tiempos de reacción cortos (3 h) y en condiciones de reacción suaves. Además, no sólo se consigue un rendimiento atómico más elevado, respecto a la reacción de producción de biodiésel convencional (porque no se genera glicerol como subproducto).

A pesar de estos buenos resultados obtenidos en la reacción de transesterificación de aceite de girasol con etanol para producir FAEE y MG, desafortunadamente, el principal inconveniente de este biocatalizador es el mismo que el manifestado en la N435, la dificultad de su separación del medio de reacción, ya que se emulsiona fácilmente en la primera reacción, convirtiéndose en un material gelatinoso muy incómodo de manejar en las reutilizaciones sucesivas, por lo que es necesario la centrifugación de los productos de reacción para conseguir la recuperación del catalizador. Esta etapa de centrifugación adicional puede constituir un inconveniente importante para la aplicación del proceso a una escala industrial (C. Luna, C. Verdugo, et al., 2014c).

4.2.3. CEPA ESTÁNDAR DE C. ANTARCTICA DE LA C.E.C.T.

Dentro de la estrategia general dirigida a la obtención de biocatalizadores capaces de realizar la etanolisis enzimática de una forma económicamente viable, se ha explorado la posibilidad de emplear extractos enzimáticos muy poco purificados. De esta forma su costo económico será mucho menor que el de los preparados enzimáticos comerciales disponibles, mucho más purificados, pero también mucho más caros. A este fin se ha estudiado una cepa de lipasas CALB estándar, con la que se han realizado diversos estudios encaminados a dilucidar las condiciones óptimas de crecimiento y su correspondiente capacidad transesterificadora. Para este estudio se ha empleado una cepa estándar de la C.E.C.T. (Colección Española de Cultivos Tipo) (H. S. Kim et al., 2002; Salis, Svensson, Monduzzi, Solinas, & Adlercreutz, 2003). Los diferentes cultivos obtenidos se han ensayado como biocatalizadores en la reacción de transesterificación de aceite de girasol con etanol en condiciones estándar para obtener Ecodiésel (FAEE + MG).

a) MEDIDA DEL CRECIMIENTO DE LA CEPA MICROBIANA ESTANDAR EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO.

En este estudio se mide la evolución del crecimiento de la cepa estándar CALB de la CECT, a través de las medidas de absorbancia a 600 nm, cada 24 h y se representan los resultados en la **Figura 4.34**.

Tras evaluar estos resultados visualizados en la **Figura 4.34** se estima que los medios más apropiados son YPD e YPL (mejor sin tributirina) y que el tiempo óptimo de cultivo son 72 h.

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

b) RENDIMIENTO DE LOS EXTRACTOS ENZIMÁTICOS COMO BIOCATALIZADOR EN LA REACCIÓN DE TRANSESTERIFICACIÓN.

Una vez obtenidos los extractos en los medios óptimos (YPD e YPL), con y sin tributirina, y con el tiempo de crecimiento determinado como más apropiado (72 h) operando como se detalla en el **apartado 2.2.2.**, se procede a su evaluación como biocatalizador en la reacción de transesterificación de aceite de girasol con etanol, para obtener el biocombustible Ecodiésel, consistente en una mezcla de FAEE y MG, fundamentalmente.

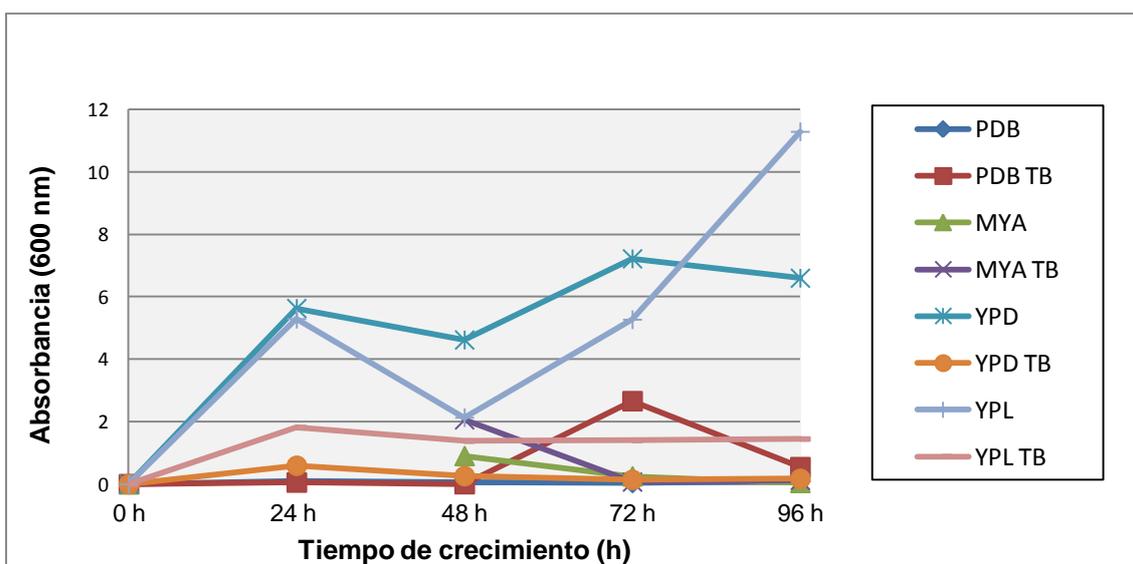


Figura 4.34. Evolución del crecimiento de la cepa de *C. antarctica* de la CECT en diferentes medios de cultivo, con y sin tributirina.

Tras aplicar las condiciones estándar de reacción, optimizadas con el sistema enzimático, Lipopan 50 BG, que se ha utilizado también de referencia para los extractos enzimáticos (6 ml aceite, 1.75 ml EtOH, 30°C, 25 μ L disolución acuosa de

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

NaOH 10 N, agitación mayor de 300 rpm, durante 24 h de reacción), se obtienen los resultados, recogidos en la **Figura 4.35**.

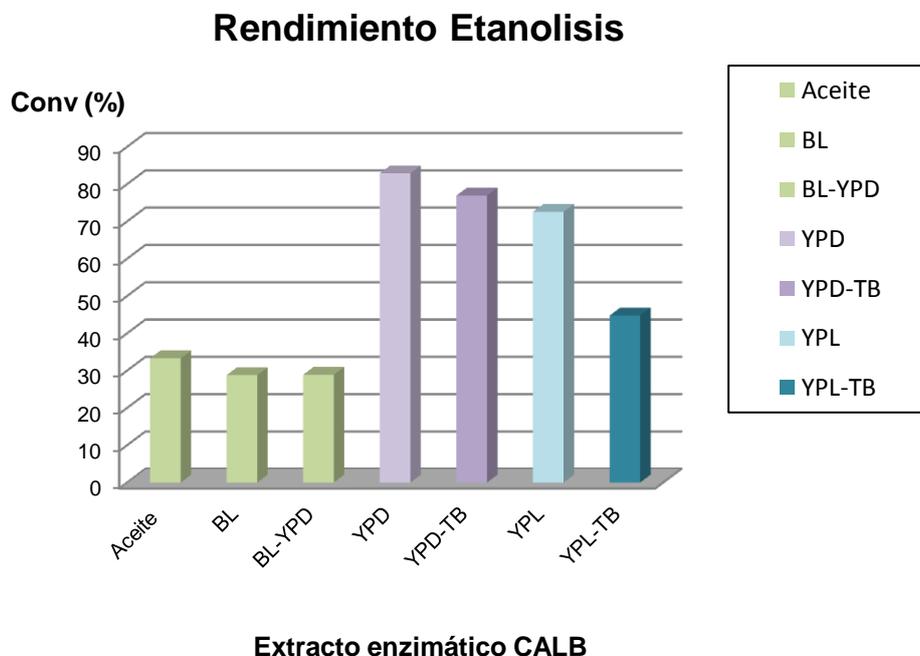


Figura 4.35. Rendimiento de la reacción de transesterificación selectiva operando bajo las condiciones de reacción estándar: 6 ml aceite, 1.75 ml EtOH, 30°C, 25 µL disolución acuosa NaOH 10 N, agitación mayor de 300 rpm, durante 24 h., empleando como biocatalizador 0.5 g de extracto enzimático de una cepa estándar de *C. antarctica* de la CECT, obtenida a partir de un cultivo líquido, realizado en diferentes medios de cultivo.

La evolución del rendimiento a lo largo del tiempo de reacción se recoge en la **Figura 4.36**. Aquí podemos comprobar que a partir de 6 horas, en todos los casos, se consiguen los valores óptimos de conversión.

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

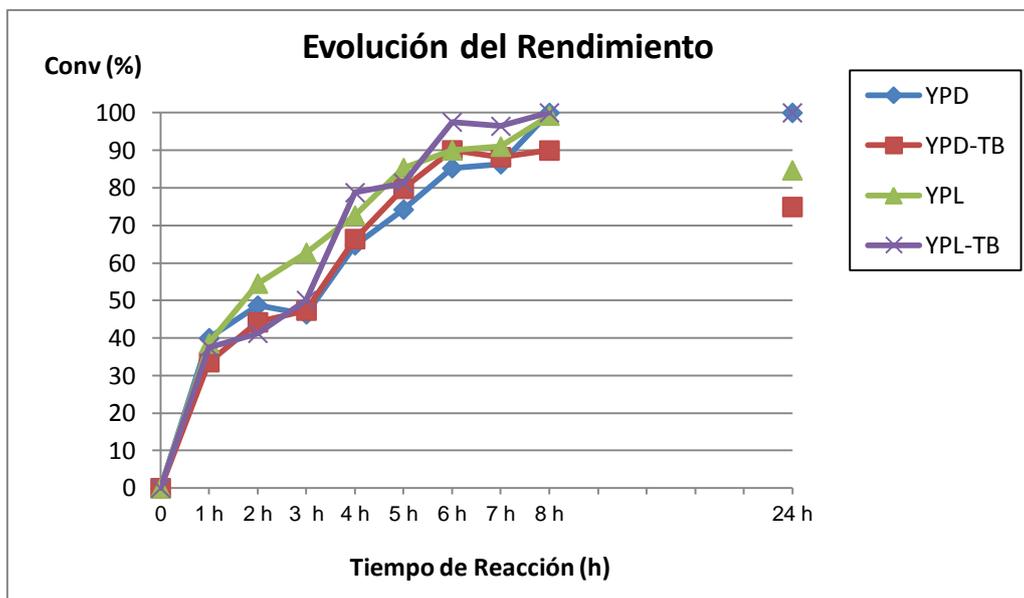


Figura 4.36. Evolución del rendimiento de la reacción de transesterificación a lo largo del tiempo de reacción, operando en condiciones estándar: 6 ml aceite, 1.75 ml EtOH, 30°C, 25 μ L disolución acuosa NaOH 10 N, agitación mayor de 300 rpm, durante 24 h., empleando como biocatalizador 0.5 g de extracto enzimático de una cepa estándar de *C. antarctica* de la CECT, obtenido a partir de un cultivo líquido realizado en diferentes medios de cultivo.

c) ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO EN REACCIONES SUCESIVAS.

Dado que es un parámetro esencial, se han realizado los diferentes experimentos con reacciones sucesivas efectuadas bajo idénticas condiciones experimentales, empleando el mismo sistema biocatalítico, para comprobar su estabilidad y vigorosidad. El tiempo de reacción para cada experimento es de 6 h, dado que es el tiempo donde se alcanzan los niveles óptimos de rendimiento. Los resultados obtenidos, recogidos en la **Tabla 3.38.**, se representan en la **Figura 4.37.**

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

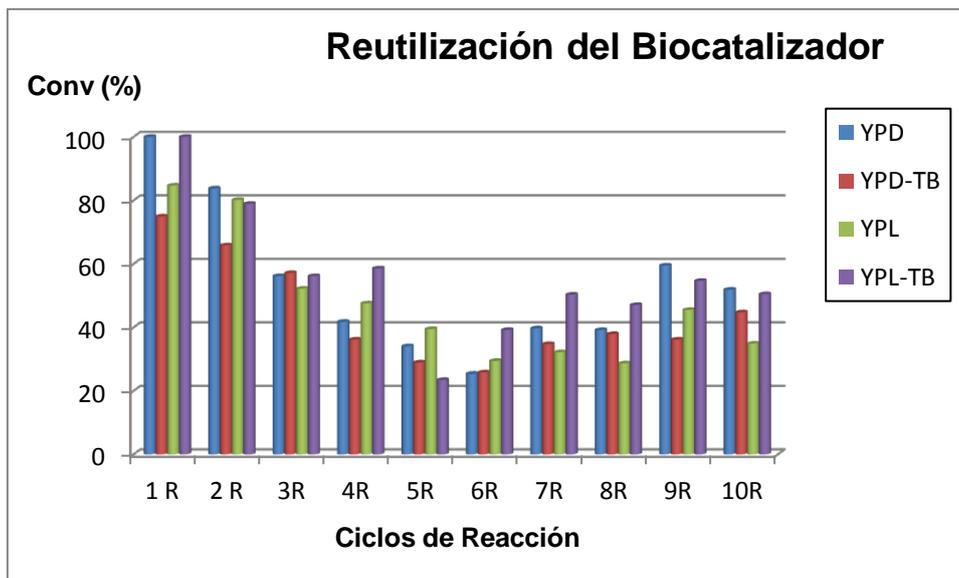


Figura 4.37. Rendimiento de la reacción de transesterificación efectuada en sucesivas reutilizaciones del mismo sistema biocatalítico, operando bajo condiciones de reacción estándar: 6 ml aceite, 1.75 ml EtOH, 30°C, 25 μ L de disolución acuosa NaOH 10 N, agitación mayor de 300 rpm, durante 6 h. Como biocatalizador se aplica 0.5 g de extracto enzimático de una cepa estándar de *C. antarctica* de la CECT, obtenido a partir de un cultivo líquido, realizado en diferentes medios de cultivo.

d) DISCUSIÓN GENERAL.

Tenemos por tanto que, a través de una metodología muy sencilla de extracción y purificación de las enzimas de un cultivo, consistente en una liofilización con diálisis previa, se puede acceder a un material enzimático, capaz de obtener no sólo los requisitos mínimos para llevar a cabo el proceso de alcoholisis enzimática, sino incluso resultados incluso mejores que los obtenidos con las lipasas comerciales, más purificadas y mucho más caras. Tenemos por tanto que es claramente ventajoso acceder a la producción de Ecodiésel empleando extractos lipásicos obtenidos de cultivos, de una manera sencilla y económica, en lugar de emplear las lipasas purificadas disponibles en el mercado, como la PPL (Caballero et al., 2009; C. Luna et

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

al., 2013; D. Luna et al., 2012; C. Verdugo et al., 2010), Lipopan 50 BG (C. Luna, E. D. Sancho, et al., 2014; Cristobal Verdugo et al., 2011), Biolipasa R (C. Luna, C. Verdugo, et al., 2014a, 2014b) o N435 (C. Luna, C. Verdugo, et al., 2014c), todas ellas estudiadas anteriormente.

Además, según los resultados de los estudios de rendimiento a lo largo de su tiempo de reacción, **Figura 4.36** y en reacciones sucesivas, **Figura 4.37**, del extracto a partir de la cepa estándar de *C. antarctica*, como biocatalizador de forma libre, en la reacción de etanolisis de aceite de girasol, operando bajo las mismas condiciones experimentales estándar, se puede concluir la capacidad de estos extractos para ser reutilizados, lo que representa un aspecto muy positivo para la posible aplicación de estos extractos enzimáticos, libres o inmovilizados, en cualquier soporte convencional.

Estos materiales enzimáticos obtenidos mediante cultivos y técnicas de purificación muy simples, se presentan como biocatalizadores óptimos de muy bajo costo, ya que no han sido sometidos a ningún tratamiento de purificación adicional y de costo elevado, como la cromatografía o electroforesis, por lo general aplicadas para obtener las enzimas purificadas comerciales habituales. Por lo tanto, 0,5 g de estos materiales son capaces de desarrollar una actividad enzimática similar a 0.01-0.04 g de una lipasa comercial, mucho más complicada de obtener y costosa, por lo que en este material enzimático muy poco purificado, hay suficiente cantidad de lipasa capaz de llevar a cabo reacciones de etanolisis selectiva de triglicéridos para obtener las mezclas de FAEE y MG que constituyen el biocombustible Ecodiésel.

En consecuencia, estos extractos lipásicos de bajo costo se muestran especialmente eficientes en la obtención de procesos de etanolisis 1,3 selectivas, donde el glicerol se mantiene como MG en la mezcla de biocombustibles, junto con los diferentes FAEEs obtenidos y con el exceso de etanol sin reaccionar. De esta manera, se consigue un nuevo tipo de biodiésel llamado Ecodiésel, constituido por una mezcla

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

de monoacilgliceroles y FAEEs, que se puede utilizar en diferentes mezclas con combustible diésel, sin más separación o proceso de purificación. Este nuevo biocombustible también se puede obtener en tiempos de reacción relativamente cortos (6 horas) y en condiciones de reacción suaves. Además, se consigue un rendimiento atómico óptimo (100%) porque no se genera glicerol como subproducto, con lo que no es necesario realizar una etapa de purificación del glicerol residual, por lo que se podría utilizar directamente tras su producción.

4.3. CEPAS MICROBIANAS SILVESTRES.

A fin de mejorar la eficiencia del proceso enzimático se ha recurrido a la búsqueda, evaluación y selección de cepas microbianas silvestres recogidas en ambientes lipófilos (aceites vegetales y grasas animales), a partir de las cuales se obtienen extractos enzimáticos lipásicos 1,3-selectivos, capaces de realizar reacciones de transesterificación útiles en la síntesis de biocombustible de segunda generación. Para ello se procede a la recogida de muestras, aislamiento de microorganismos con actividad lipolítica y, de entre estos, aquellos que muestran actividad respecto a la reacción de transesterificación, como se visualiza en la **Figura 2.15**

4.3.1. CEPAS MICROBIANAS SILVESTRES RECOLECTADAS EN ACEITE VEGETAL.

Para la búsqueda, evaluación y selección de cepas microbianas silvestres se seleccionaron lugares inicialmente ricos en aceite vegetal, donde se presume más fácil el poder detectar microorganismos que alberguen lipasas con una elevada actividad transesterificadora sobre el aceite vegetal. Así, estas muestras se obtuvieron de una almazara de aceite de oliva situado en Écija (Sevilla).

a) SCREENING PRIMARIO Y SECUNDARIO:

Como se puede comprobar en la **Figura 4.38**, se han investigado un número elevado de cepas aisladas procedentes de las balsas de aceite vegetal durante la

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

primera etapa de selección, 1.016 colonias (hongos, levaduras y bacterias) se han identificado como positivas (al producir una zona de halo de hidrólisis).

Las muestras procedentes del AEA ("alpechín") produce el menor número de bacterias lipolíticas, dado que este agua residual tóxica, resultante de pulverizar las aceitunas durante la producción de aceite es bastante ácido y rico en materia orgánica (de la Fuente, Clemente, & Bernal, 2008). Así, aunque AEA es la muestra que contiene el mayor contenido de material orgánico, por lo general, casi el 50% de dicho material orgánico es lignina, que también puede afectar negativamente la actividad microbiana y su supervivencia. De hecho, los efectos fitotóxicos y antimicrobianos de fenoles, ácidos orgánicos y ácidos grasos que están generalmente presente en estas aguas residuales ("alpechín") han sido publicados previamente (Alburquerque, Gonzalvez, Garcia, & Cegarra, 2004), lo que explica el bajo número de microorganismos lipolíticos que se encuentran en esta muestra.

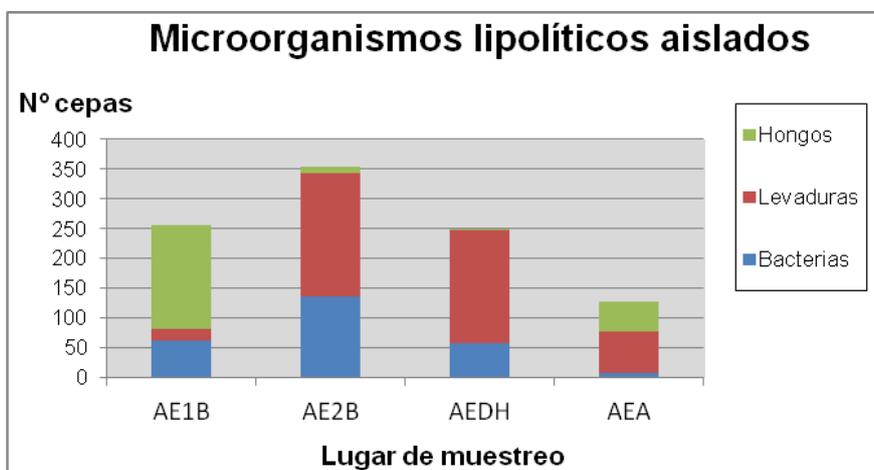


Figura 4.38. Distribución de los tipos de microorganismos lipolíticos aislados de las muestras procedentes de las balsas investigadas en una almazara de aceite de oliva situada en Écija (Sevilla).

De las cepas positivas en el primer screening, se seleccionan 291 cepas para estudios posteriores en el screening secundario, mediante el método colorimétrico en

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

medio líquido, según el procedimiento descrito por (Escobar-Nino et al., 2014; Sanchez, 2012; Teng & Xu, 2007) basado en la transesterificación de p-nitrofenolpalmitato (p-NPP) con etanol (u otro alcohol) para liberar el p-nitrofenol de color amarillo (p-NP). Con el fin de seleccionar sólo enzimas extracelulares, se llevó a cabo este segundo screening usando extractos liofilizados de las cepas seleccionadas en la primera etapa del screening. De estos, 58 cepas resultaron positivas en este screening secundario, como se indica en la **Tabla 3.40**.

Durante esta etapa se seleccionaron sólo cepas que mostraron actividad extracelular de transesterificación, ya que está descrito que a nivel industrial se obtienen rendimientos superiores en la producción de biodiésel con lipasas extracelulares, mejor que con células enteras (Ranganathan, Narasimhan, & Muthukumar, 2008; Robles-Medina, Gonzalez-Moreno, Esteban-Cerdan, & Molina-Grima, 2009). De hecho, los procedimientos de transesterificación mediante células enteras producen escasos rendimientos de conversión del sustrato debido a la toxicidad del disolvente para las células huésped, y también debido a la baja tasa de transferencia de masa de sustratos de alto peso molecular (aceite) desde de la fase del disolvente hasta el biocatalizador, en este caso la célula entera (Bajaj, Lohan, Jha, & Mehrotra, 2010). Otra diferencia notable cuando la reacción de transesterificación se lleva a cabo con células enteras es en el tiempo de reacción. Con Novozym 435 se obtienen rendimientos del 87% después de 3,5 h de reacción. Sin embargo, para obtener rendimientos de 80-90% de biodiésel usando células enteras, se requiere llevar a cabo el proceso de reacción durante 70 h (Ribeiro, de Castro, Coelho, & Freire, 2011).

En los tres restantes lugares de obtención de microorganismos se obtienen cantidades similares, aunque varía bastante la composición de estos microorganismos, ya que en un caso prevalecen los hongos y en los otros dos las levaduras.

b) SELECCIÓN DE CEPAS BACTERIANAS SILVESTRES PRODUCTORAS DE BIOCOMBUSTIBLE.

Al estudiar la eficacia biocatalítica de estos extractos, que se obtuvieron mediante liofilización, sin aplicar diálisis previa, se obtienen resultados inesperados y peores de los previstos, ya que en general se obtienen escasos rendimientos con los mismos, de forma que la mayoría de cepas presentan niveles muy bajos de rendimiento (0-10 %) como se puede comprobar en la **Figura 4.39**, donde se representa el porcentaje de cepas en función del porcentaje de rendimiento obtenido. Así mismo, resaltar que, a pesar del alto contenido en hongos (**Figura 4.38**), sólo se obtiene una cepa fúngica que manifiesta actividad transesterificadora.

Sin embargo, de acuerdo con los resultados obtenidos con los extractos procedentes de cultivos de la cepa de lipasas CALB estándar, de la C.E.C.T. (Colección Española de Cultivos Tipo), la eficiencia de todos los extractos enzimáticos extraídos de microorganismos silvestres también aumenta cuando se sometan a un proceso de diálisis previa. En efecto, se puede comprobar en la **Figura 4.40** cómo aumenta el rendimiento de la reacción de transesterificación, tras someter a algunos de estos extractos de la misma cepa a un proceso de diálisis previa, mostrándose así la importancia del proceso de filtración y pre-concentrado del extracto (diálisis), en la obtención de biocatalizadores mucho más eficaces.

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Cepas liofilizadas (origen vegetal)

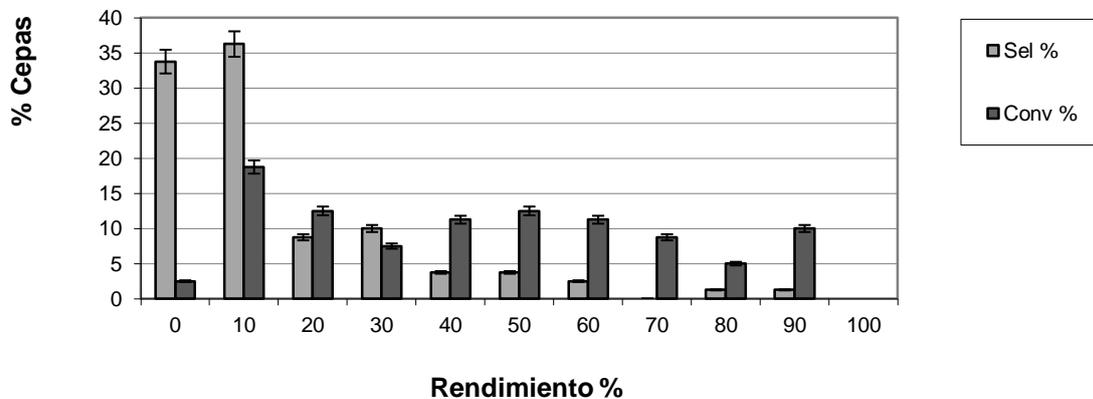


Figura 4.39. Esquema general del rendimiento obtenido del total de los extractos liofilizados (sin diálisis previa) obtenidos a partir de cultivos líquidos de cepas procedentes de la almazara de aceite de oliva investigada, consistente en 42 cepas levaduras, 38 cepas bacterianas y 1 cepa fúngica.

Es decir, de acuerdo con los resultados obtenidos con extractos procedentes de cultivos de cepas de lipasas *C. antarctica* estándar, se vuelve a obtener en todos los casos investigados, un importante aumento en el rendimiento con aquellos extractos procedentes de cepas de microorganismos silvestres sometidos a un tratamiento previo de diálisis. Así, de acuerdo a los resultados obtenidos con todas las cepas investigadas, para la obtención del material enzimático de microorganismos cultivados sin purificar, pero capaces de efectuar de forma eficiente el proceso de alcoholisis, es esencial la realización de un proceso de diálisis previa. Esta metodología simple permite acceder a un material enzimático de forma muy económica, si se le compara con el material purificado disponible comercialmente.

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Gráfico 1

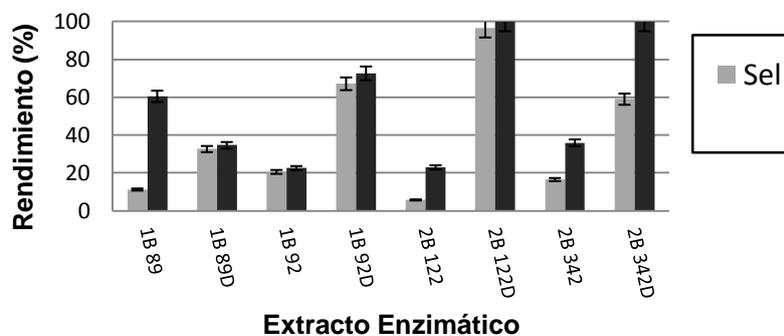


Gráfico 2

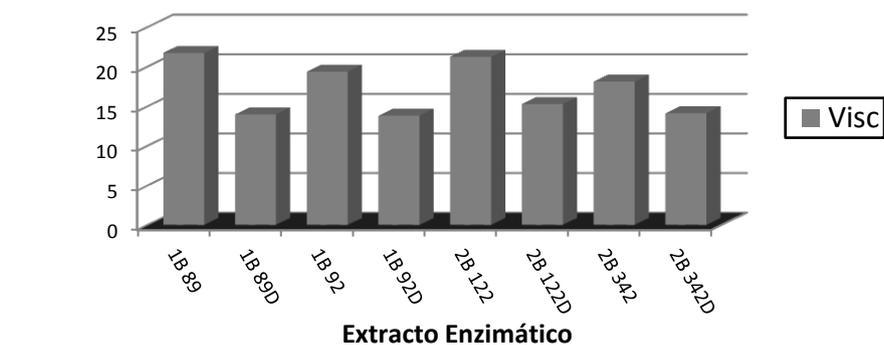


Figura 4.40. Resultados obtenidos en la reacción de transesterificación con extractos enzimáticos liofilizados sometidos o no a un proceso adicional de diálisis previa, obtenidos a partir de cultivos líquidos de la misma cepa microbiana. El tratamiento de diálisis se indica con D. Conversión y selectividad (gráfico 1) y viscosidad en centiStockes (gráfico 2).

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Así, una vez optimizado el proceso de obtención de extractos, se repite la operación con aquellas cepas con mejores resultados previos, pero aplicándole también el proceso adicional de diálisis previa. Así, se comprueba como mejora el rendimiento de los extractos notablemente, como se recogía en la **Tabla 3.43**, a partir de la cual se representa gráficamente en la **Figura 4.41** el porcentaje de cepas en función del porcentaje de rendimiento obtenido.

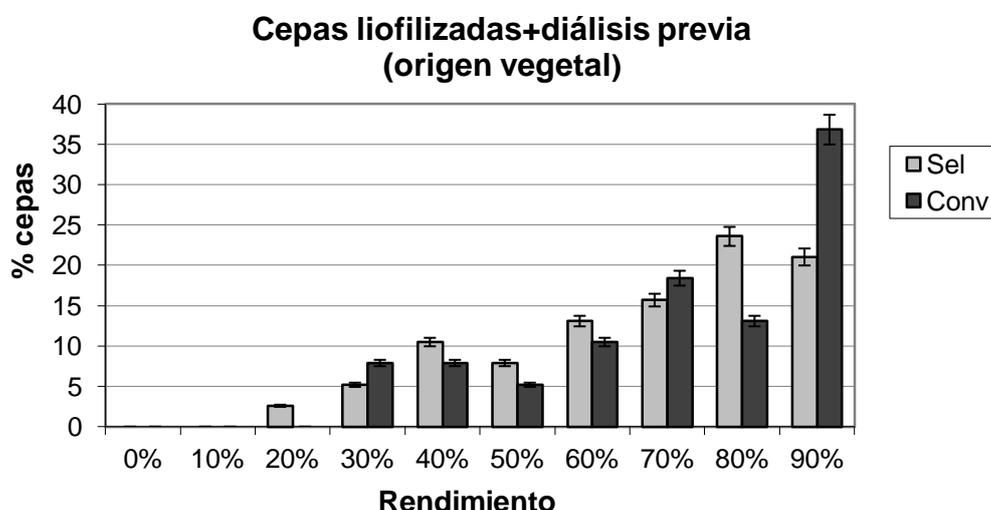


Figura 4.41. Representación del porcentaje de cepas, del total de los extractos, obtenidos por liofilización y diálisis previa, a partir de cultivos líquidos de cepas procedentes de la almazara de aceite (30 cepas bacterianas), que obtiene un determinado rendimiento.

En este caso, el análisis de los datos revela que extractos de 9 cepas bacterianas son capaces de producir más de 90% de Selectividad, 8 extractos bacterianos producían entre 80-90% de Selectividad, 11 cepas producen 60-80 % de Selectividad y la producción de los restantes 7 extractos de cepas bacterianas rinden por debajo del 60% de Selectividad.

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En general, el comportamiento catalítico de todos los extractos enzimáticos investigados es completamente idéntico al observado anteriormente en las reacciones de transesterificación realizadas aplicando los otros biocatalizadores enzimáticos comerciales estudiados: PPL, Lipopan 50 BG, Lipozyme RM IM, Biolipasa R, N435, (Caballero et al., 2009; Calero et al., 2014; C. Luna et al., 2013; C. Luna, C. Verdugo, et al., 2014b; C. Luna, C. Verdugo, et al., 2014c; Cristobal Verdugo et al., 2011; C. Verdugo et al., 2010) y extracto enzimático obtenido de CALB, adquirido en la CECT.

Desde un punto de vista de su aplicación a escala industrial, el biocombustible producido aplicando los extractos enzimáticos de estas bacterias, no requeriría el procesamiento adicional para separar el glicerol residual que se genera en la producción de biodiésel convencional, ya que el glicerol se integra en la mezcla final como MG. Esto se explica porque, en todos los casos, la enzima investigada realiza una etanolisis 1,3 selectiva del aceite de girasol, de forma que tras una reacción de etanolisis parcial de 1 mol de aceite se produce 1 mol de MG por cada 2 moles de FAEE. Si bien esta metodología no sería adecuada para producir biodiésel convencional, acorde con la norma EN 14214, sí lo sería para la producción del biocombustible Ecodiésel, que incorpora el glicerol como se ha descrito anteriormente (Caballero et al., 2009; Calero et al., 2014; C. Luna et al., 2013; C. Luna, C. Verdugo, et al., 2014b; C. Luna, C. Verdugo, et al., 2014c; Cristobal Verdugo et al., 2011; C. Verdugo et al., 2010).

c) ESTUDIO DEL RENDIMIENTO DE LAS CEPAS SILVESTRES MÁS EFICACES.

Para optimizar el empleo de las mejores cepas silvestres para la producción de biocombustibles se estudia la evolución del rendimiento a lo largo del tiempo de reacción y tras la aplicación de varios ciclos de reacción al ser reutilizado el extracto enzimático biocatalítico, obtenido de las cepas más eficaces (1B89, 2B122, 2B342,

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

1BH68, 1B92, 2B220, 2B222) (Figura 4.42 a Figura 4.44) y a lo largo del tiempo de reacción (Figura 4.45 a Figura 4.48).

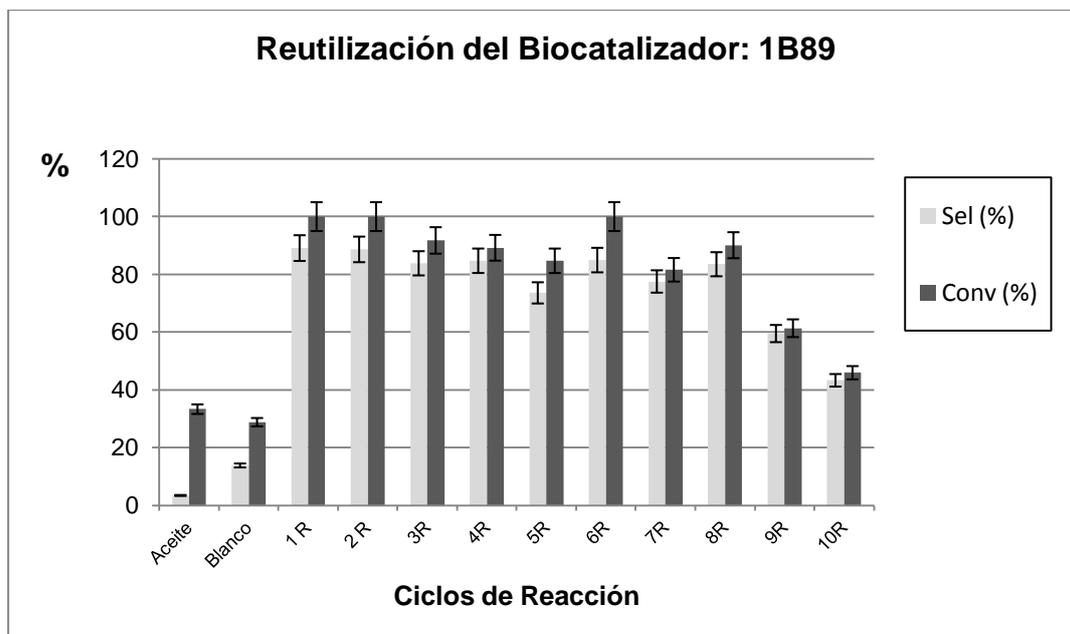


Figura 4.42. Rendimiento de los extracto lipásicos de la cepa 1B89 operando en sucesivos ciclos de reacción al ser reutilizada operando en condiciones estándar (37 °C, 24 horas, min 300 rpm, operando con 6 ml de aceite, 1.75 ml etanol absoluto y 0.0125 ml de disolución acuosa de NaOH 10N).

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

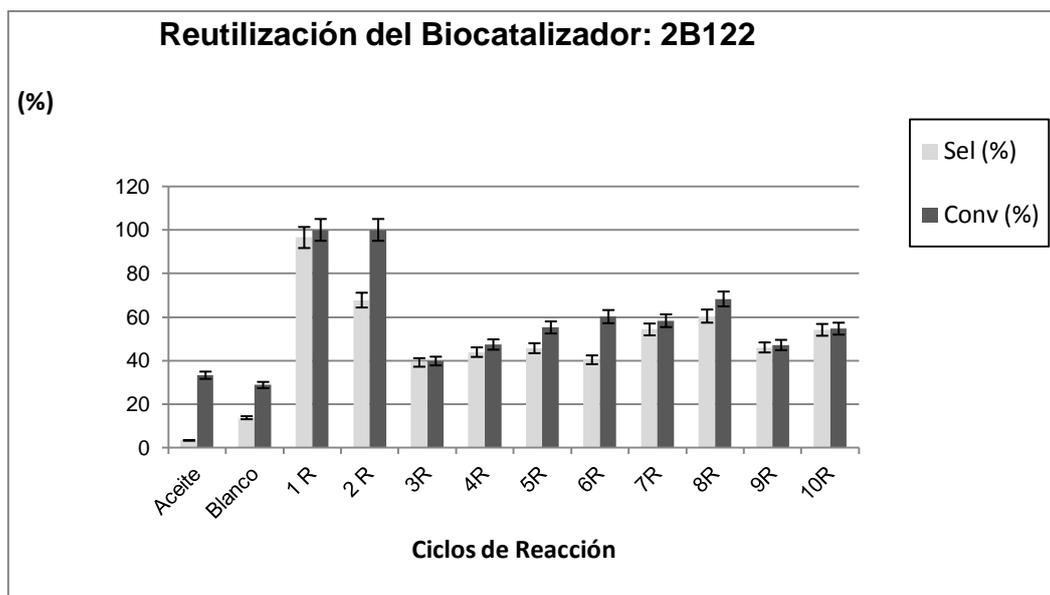


Figura 4.43. Rendimiento del extracto lipásico de la cepa 2B122 (*G. Terribacillus*) operando en sucesivos ciclos de reacción al ser reutilizada operando en condiciones estándar (37 °C, 24 horas, min 300 rpm, operando con 6 ml de aceite, 1.75 ml etanol absoluto y 0.0125 ml de disolución acuosa de NaOH 10N).

Tras comprobar que varios extractos lipásicos permiten su reutilización en varios ciclos sucesivos, entre cinco y diez usos, evaluados en tiempos elevados de reacción, 24 horas, se hace necesario optimizar el tiempo adecuado para conseguir el rendimiento óptimo de las reacciones de etanolísis, efectuado en condiciones estándar. Para ello se estiman los valores de conversión y selectividad cada hora. Los resultados obtenidos se recogen en las **Figura 4.45 a 4.48**, donde se puede comprobar que los valores de conversión y selectividad, en las cuatro cepas estudiadas, alcanzan en la segunda hora de funcionamiento, aproximadamente valores similares a los conseguidos a las 24 horas de reacción.

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

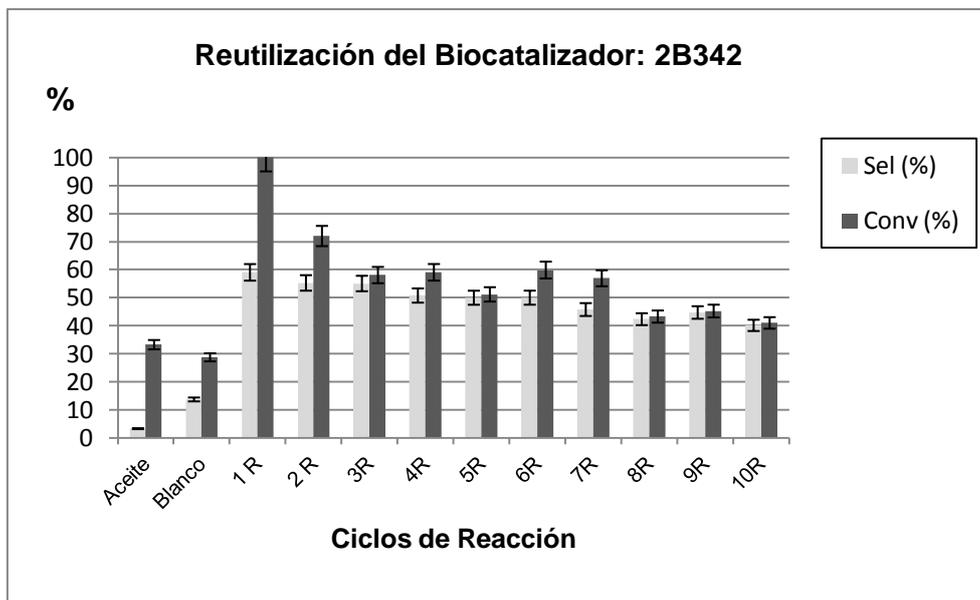


Figura 4.44. Rendimiento del extracto lipásico de la cepa 2B342 operando en sucesivos ciclos de reacción al ser reutilizada operando en condiciones estándar (37 °C, 24 horas, min 300 rpm, operando con 6 ml de aceite, 1.75 ml etanol absoluto y 0.0125 ml de disolución acuosa de NaOH 10N).

Esto puede comprobarse gráficamente en la **Figura 4.45**, donde se puede seguir la evolución del proceso, mediante los cromatogramas correspondientes, obtenidos a cada hora de reacción. Así, en la primera hora se muestra un pico ancho correspondiente a los DG y/o TG, que aparecen a tiempos de retención (RT) de 45-55 minutos, que aún no han experimentado ningún proceso de transesterificación. En la segunda hora de reacción este pico se estrecha, quedando un pico fino y alargado a RT 49. Los picos correspondientes a los FAEE/MG (RT en el intervalo 18-36) aumentan bastante a partir de la segunda hora de reacción.

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

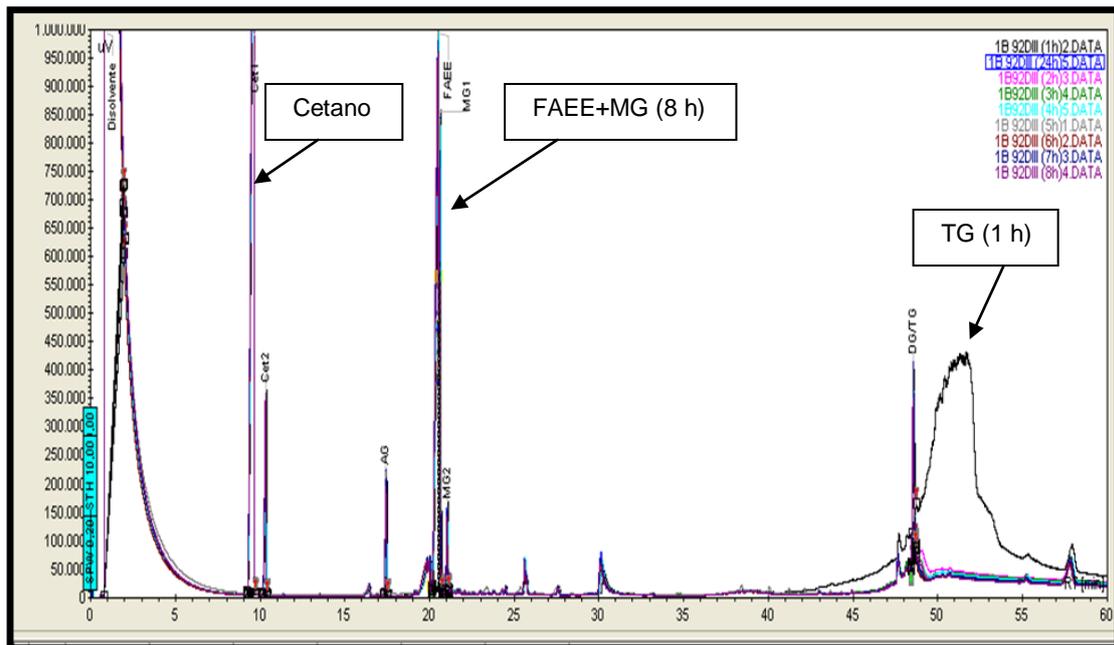
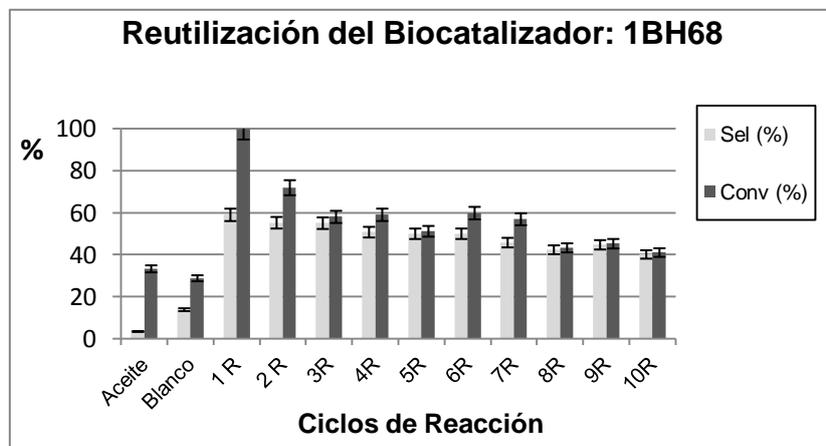


Figura 4.45. Cromatogramas superpuestos correspondientes a cada hora de reacción en la etanolisis realizada por un extracto de la cepa AE1B 92 (*G. Enterobacter*) procedente de un microorganismo silvestre.

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

(a)



(b)

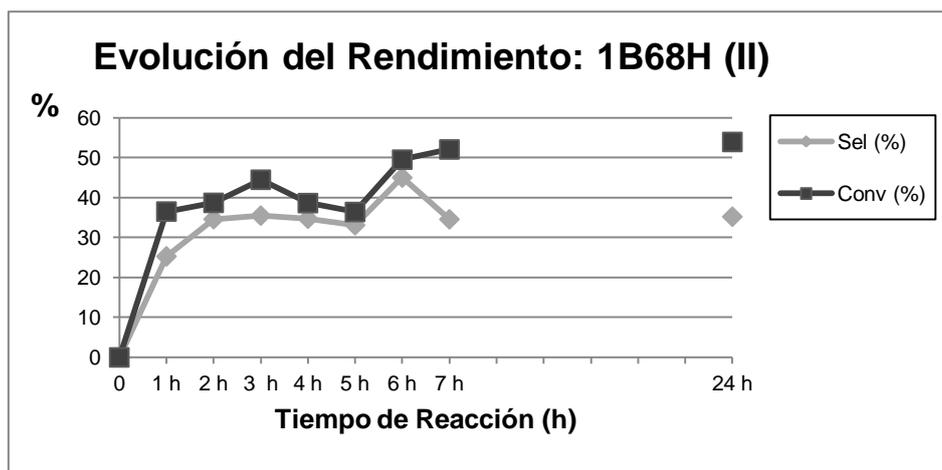
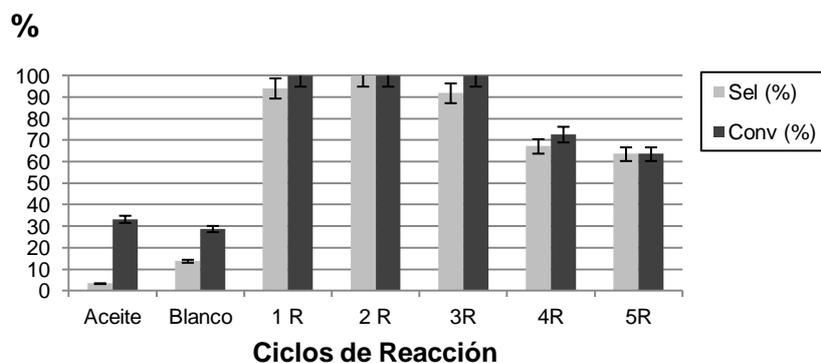


Figura 4.46. Rendimiento del extracto lipásico de la cepa 1BH68 (a) operando en sucesivos ciclos de reacción al ser reutilizada operando en condiciones estándar (37 °C, 24 horas, min 300 rpm, operando con 6 ml de aceite, 1.75 ml etanol absoluto y 0.0125 ml de disolución acuosa de NaOH 10N) y (b) evolución del rendimiento obtenido cada 60 minutos.

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

(a)

Reutilización del Biocatalizador: 1B92



(b)

Evolución del Rendimiento: 1B92 (III)

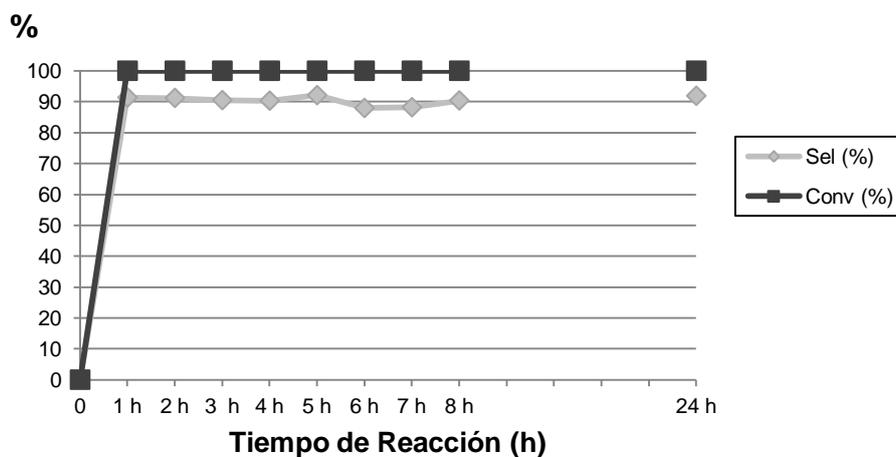
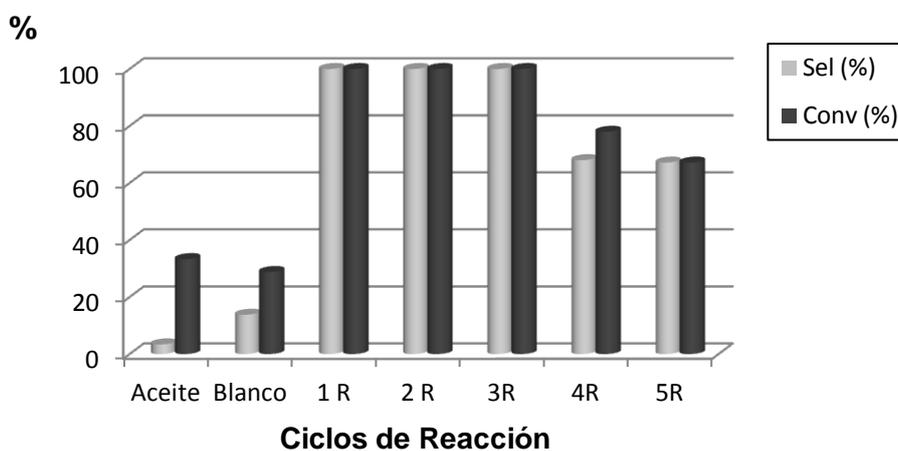


Figura 4.47. Rendimiento de los extracto lipásicos de la cepa 1B92 (*G. Enterobacter*) (a) operando en sucesivos ciclos de reacción al ser reutilizada operando en condiciones estándar (37 °C, 24 horas, min 300 rpm, operando con 6 ml de aceite, 1.75 ml etanol absoluto y 0.0125 ml de disolución acuosa de NaOH 10N) y (b) evolución del rendimiento obtenido cada 60 minutos.

Reutilización del Biocatalizador: 2B220



Evolución del Rendimiento: 2B220 (II)

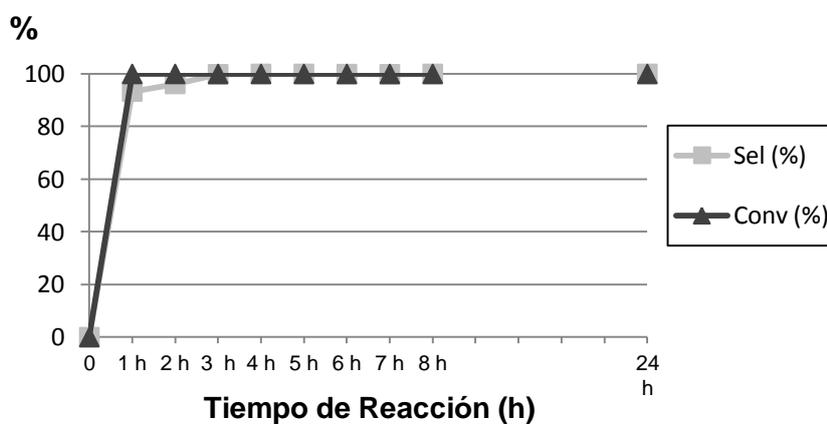
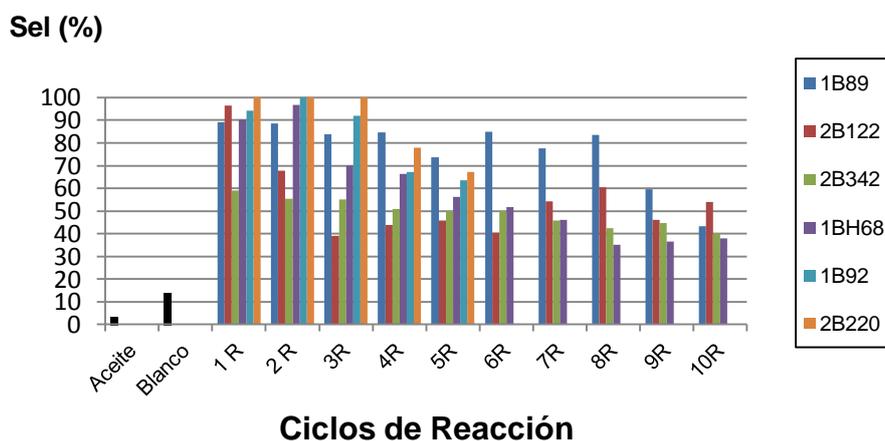


Figura 4.48. Rendimiento de los extracto lipásicos de la cepa 2B220 (a) operando en sucesivos ciclos de reacción al ser reutilizada operando en condiciones estándar (37 °C, 24 horas, min 300 rpm, operando con 6 ml de aceite, 1.75 ml etanol absoluto y 0.0125 ml de disolución acuosa de NaOH 10N) y (b) evolución del rendimiento obtenido cada 60 min.

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

(a)

Reutilización de los Biocatalizadores



(b)

Evolución del Rendimiento del sistema Biocatalítico

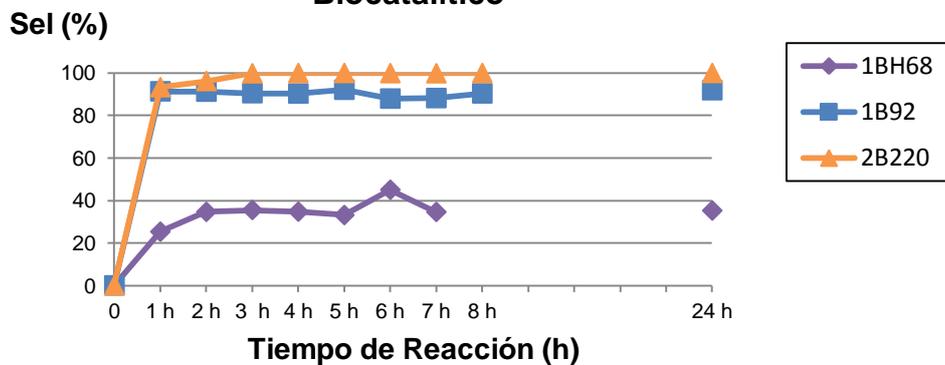


Figura 4.49. Rendimiento de los diferentes extractos, según los datos recogidos en las Figuras 4.42 a 4.48, operando en las mismas condiciones de reacción estándar (a) en sucesivos ciclos y (b) la evolución del rendimiento cada 60 minutos.

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

A efectos de conseguir una visión general del comportamiento de todas las cepas investigadas se recogen en la **Figura 4.49**, de forma que podemos determinar así las más eficaces, en su aplicación en varios ciclos de reacción o cuáles han alcanzado antes su máximo rendimiento. Se puede observar cómo las cepas 2B220, 2B122 (*G. Terribacillus*) y 1B92 (*G. Enterobacter*) son las más eficaces, ya que consiguen valores de Selectividad superiores al 80% en los cuatro primeros usos, así como la cepa 1B89 se muestra como la más estable, dado que mantiene su Selectividad por encima del 80% durante 8 reusos.

d) CARACTERIZACIÓN FILOGENETICA DE LAS CEPAS MÁS EFICACES Y ESTUDIO MÁS EXHAUSTIVO DE LA CEPA AE2B122 (G. TERRIBACILLUS).

Con el fin de asignar a las cepas bacterianas productoras de biocombustibles a grupos filogenéticos específicos, fue determinada la secuencia del gen rRNA 16S, como se recoge en la **Tabla 3.52** y se representa en la **Figura 4.50** en forma de árbol filogenético. De esta forma se obtiene información relativa al pariente más cercano a cada una de las cepas aisladas.

De acuerdo con los resultados obtenidos tras el análisis filogenético se puede concluir que las cepas aisladas fueron muy diversas con representantes de ambas, bacterias Gram positivas y Gram negativas. Este análisis, junto con el elevado número de microorganismos eucariotas (levaduras y hongos) también aislados durante este trabajo, sugiere que hay una gran diversidad de organismos que viven en las muestras de los desechos de almazara y molinos de aceite de oliva.

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

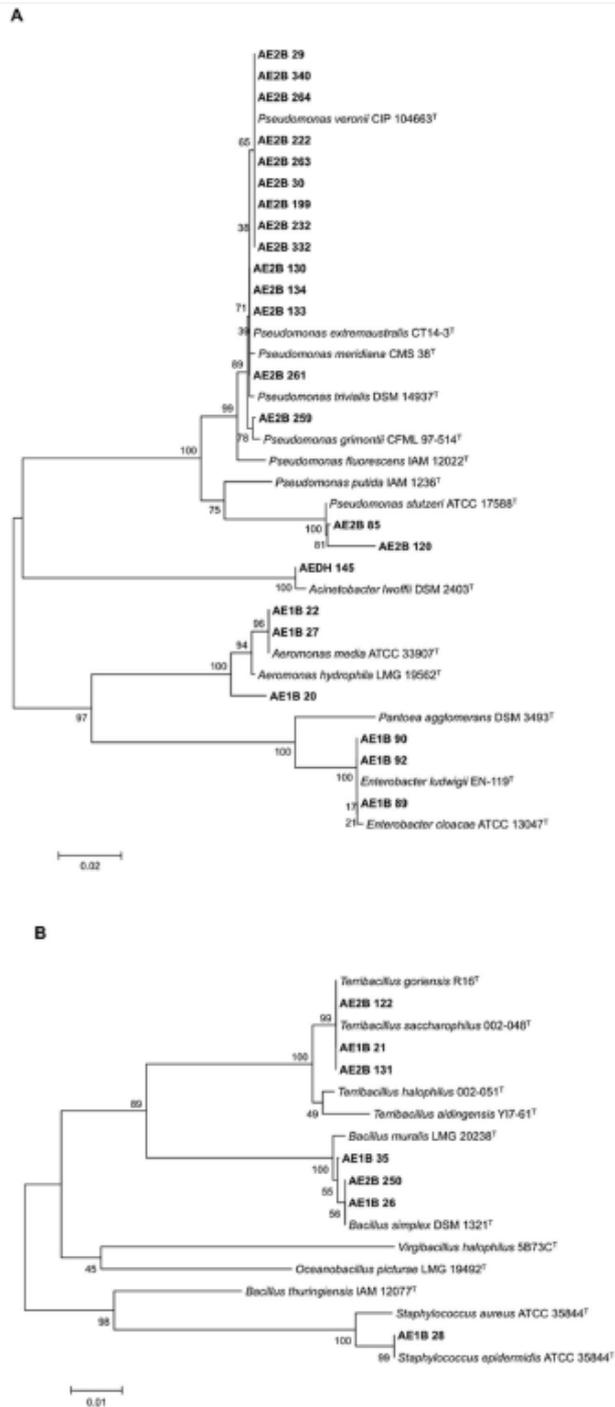


Figura 4.50. Relaciones evolutivas de las cepas seleccionadas. Árboles filogenéticos obtenidos de las secuencias del rRNA 16S de 23 cepas bacterianas gram negativas (A) y (B) 7 cepas Gram positivas.

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La mayoría de las cepas lipolíticas aisladas se obtuvieron de las muestras AE2B (19 cepas aisladas): 16 de ellos estaban relacionados con el género *Pseudomonas*, 2 de ellos relacionados con el género *Terribacillus*, y una cepa relacionada con el género *Bacillus*. Once cepas lipolíticas se obtuvieron del conjunto de muestras pertenecientes a la AE1B, que se relaciona con los géneros *Enterobacter* (3 cepas), *Aeromonas* (3 cepas), *Bacillus* (2 cepas) y *Terribacillus* (una cepa). Sólo se obtuvo una cepa de las muestras AEDH, que se relaciona con el género *Acinetobacter*. Curiosamente, no hay cepas lipolíticas seleccionadas de las muestras de AEA o "alpechín".

Las cepas aisladas que mostraron el mayor rendimiento en la producción de biocombustible (selectividad más del 60%) son 14 cepas pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Bacillus*, y *Terribacillus* (**Tabla 3.43** y **Tabla 3.52**). Sus relaciones más cercanas fueron *Pseudomonas veronii* (Elomari et al., 1996) (AE2B 30, AE2B 29, AE2B 222), *Pseudomonas extremaustralis* (Lopez et al., 2009) (AE2B 130, AE2B 261), *Acinetobacter woffii* (Brisou & Prevot, 1954) (AEDH 145), *Enterobacter ludwigii*, (Hoffmann et al., 2005) (AE1B 89 y AE1B 92), *Bacillus simplex* y *B. muralis* (Heyrman et al., 2005) (AE1B 26 y AE1B 35), *Aeromonas hydrophila* y *A. media* (22 AE1B y AE1B 20), y *Terribacillus goriensis* (Krishnamurthi & Chakrabarti, 2008) y *Terribacillus saccharophilus* (An, Asahara, Goto, Kasai, & Yokota, 2007) (AE1B 21 y AE2B 122).

Algunos de estas cepas aisladas seleccionadas pertenecen a géneros que ya han sido previamente descritas como con capacidad de expresar la actividad de transesterificación, por ejemplo, *Pseudomonas*, *Enterobacter* y *Bacillus*. Otros microorganismos que han sido descritos como portadores de lipasas con actividad de transesterificación son *P. fluorescens*, *P. cepacia*, *Rhizomucor miehei*, *Rhizopus oryzae*, *Candida rugosa*, *Thermomyces lanuginosus*, *Candida antarctica*, *Chromobacterium*

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

viscosum, *Burkholderia cepacia*, *E. aerogenes*, *Mucor miehei*, *Penicillium expansum* y *B. subtilis* (Bajaj et al., 2010) [31].

Sin embargo, las dos cepas con las que se consiguen mayores rendimientos pertenecen al género *Terribacillus* (AE2B122, AE1B21) que hasta la fecha no ha sido caracterizada como catalizador enzimático en la producción de biocombustibles. Por lo tanto, este procedimiento ha permitido identificar nuevos géneros útiles en esta área, habiéndose ya solicitado la correspondiente patente al respecto (Mellado, Escobar, Canovas, & Luna, 2013). Así, estas cepas pudieran ser de gran interés en su aplicación a escala industrial.

Tras identificar la cepa silvestre más eficiente, se estudia el medio de cultivo más idóneo para la misma. Así, tras sembrar la misma cepa (AE2B 122), del género *Terribacillus*, en dos medios diferentes (LB y PYA), se confirma de acuerdo con los resultados recogidos en la **Figura 4.51**, que el microorganismo crece mejor y produce un extracto enzimático más eficaz en el medio LB que en el medio PYA (Y.-G. Kim et al., 2007), a pesar que en el primer medio a las 48 h de su crecimiento se lisa y muere.

La concentración de microorganismos en el medio de cultivo también influye en el rendimiento del extracto obtenido. Así, se puede observar en la **Figura 4.52** que se produce un extracto enzimático más eficaz en cultivos a una concentración intermedia en población de colonias, según se determina a partir de los valores intermedios obtenidos en su densidad óptica.

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

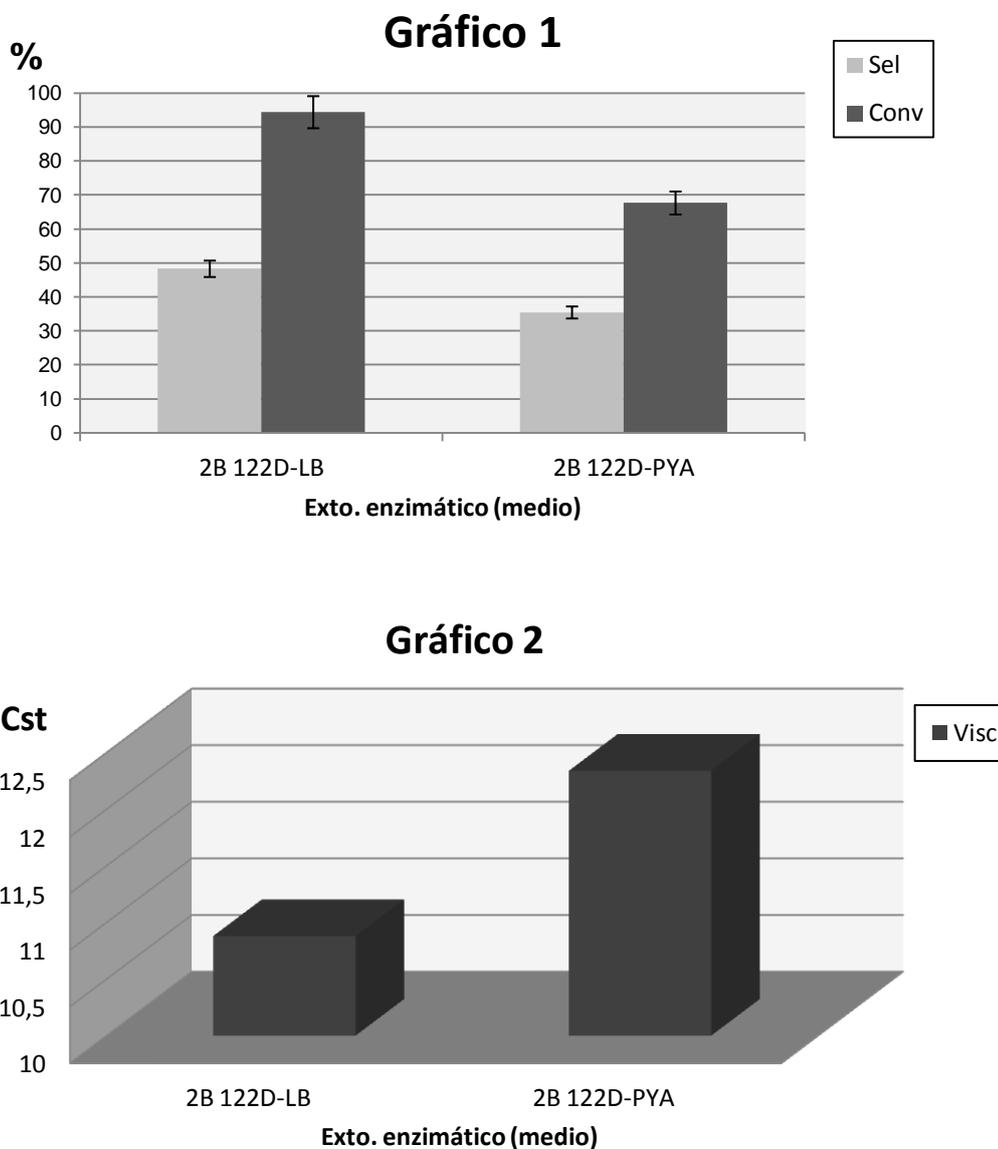


Figura 4.51. Resultados obtenidos en la transesterificación enzimática de aceite de girasol empleando un extracto liofilizado, previamente dializado, de la muestra 2B 122D (*G. Terribacillus*), habiendo crecido en diferente medio de cultivo (medio LB vs. Medio PYA). Condiciones de operación, 37 °C, 24 horas, 300 rpm, operando con 6 ml de aceite, 1.75 ml etanol absoluto y 0.0125 ml de disolución acuosa 10N. Conversión y selectividad (gráfico 1) y viscosidad en centiStockes (gráfico 2).

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

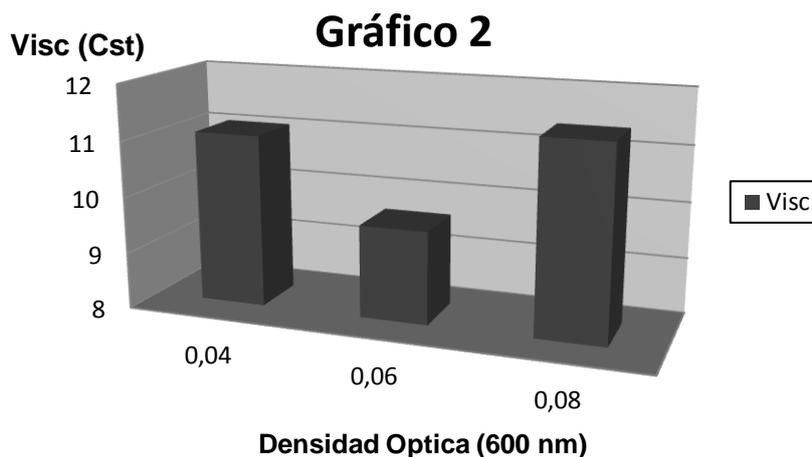
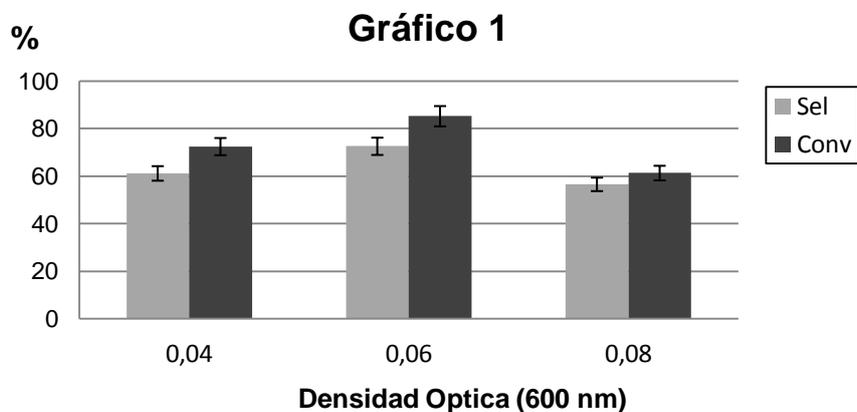


Figura 4.52. Resultados obtenidos en la transesterificación enzimática de aceite de girasol empleando un extracto lipásico liofilizado, previamente dializado, de la muestra 2B 122D, habiendo crecido en medio de cultivo en diferente extensión como muestra su densidad óptica. Condiciones de operación, 37 °C, 24 horas, 300 rpm, operando con 6 mL de aceite, 1.75 ml etanol absoluto y 0.0125 ml de disolución acuosa de NaOH 10N.

4.3.2. CEPAS MICROBIANAS SILVESTRES RECOLECTADAS EN AMBIENTES CON GRASA ANIMAL.

De las 3.103 cepas bacterianas y 952 cepas fúngicas aisladas de tres muestras diferentes recogidas en ambientes con grasa animal, utilizando diferentes medios de cultivo y temperaturas, fueron seleccionados para realizar un análisis más prolijo 20 bacterias y 3 hongos. Debido a la baja conversión que presentan los hongos estudiados (**Tabla 3.52**), este análisis se centra en el grupo de microorganismos bacterianos. Los resultados obtenidos indican que la mayoría de las cepas bacterianas presentan una eficiencia (Selectividad o porcentaje relativo de FAEE+MG) comprendida entre el 20 y 80 %. Por encima de este valor sólo encontramos las cepas HR21.6, HR21.59, HR21.62B, HR21.63, HR21.63B y HR21.65. De entre éstas, sólo dos de ellas consiguen más de un 90% de Conversión y Selectividad las HR21.65 y HR21.59, respectivamente, como se puede comprobar en la **Tabla 3.58**, a partir de la cual podemos adquirir una visión de conjunto, en la **Figura 4.53**, respecto a la proporción relativa de cepas que presenta un porcentaje de rendimiento determinado.

En conjunto, si comparamos la eficacia de los extractos aislados de los entornos con aceites vegetales con la de aquellos extraídos de ambientes con grasas animales (**Figuras 4.41 y 4.53**) podemos concluir que los extractos procedentes de cepas extraídas de ambientes con grasa animal tienen un rendimiento global aceptable, pero claramente inferior a los resultados obtenidos con los extractos originarios de ambientes con aceite vegetal, como se aprecia en la **Figura 4.54**, donde se puede comprobar que mientras el 35% de cepas de ambientes vegetales alcanza un 90 % de Conversión, sólo un 20% de las cepas de entornos de grasa animal alcanza este valor de Conversión.

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Cepas liofilizadas con diálisis previa (grasa animal)

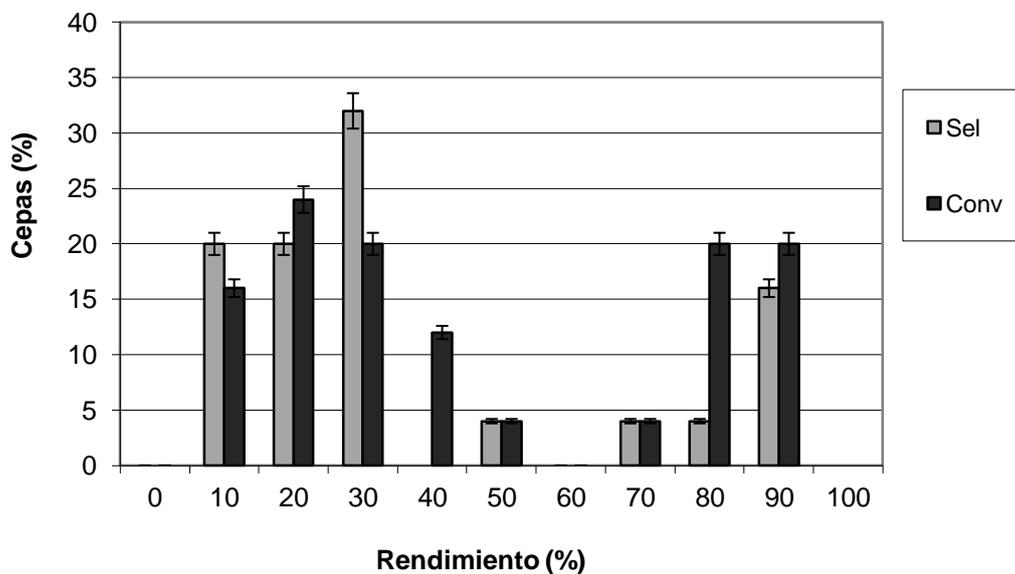


Figura 4.53. Distribución del rendimiento del total de los extractos lipásicos, obtenidos por liofilización y diálisis previa, a partir de cultivos líquidos de cepas procedentes de ambientes con grasas animales (serrín de pescado) (20 cepas bacterianas).

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

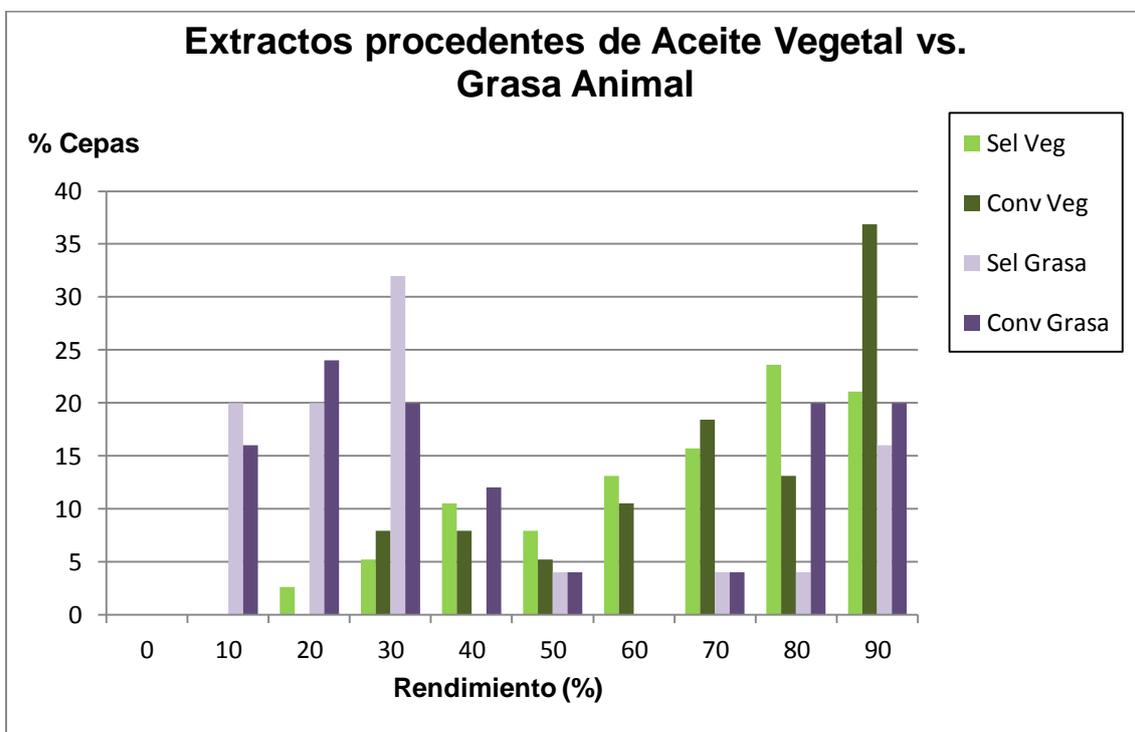


Figura 4.54. Distribución del rendimiento del total de los extractos lipásicos, obtenidos por liofilización y diálisis previa, a partir de cultivos líquidos de cepas procedentes de ambientes con aceites vegetales (30 cepas bacterianas) y de ambientes con grasas animales (serrín de pescado) (20 cepas bacterianas).

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

a) ESTUDIO DEL RENDIMIENTO DE LAS CEPAS MÁS EFICACES RECOLECTADAS EN AMBIENTES CON GRASA ANIMAL.

Para evaluar adecuadamente las cepas más eficientes, HR21-26 y HR21-65 respectivamente, se procede a determinar la evolución del rendimiento a lo largo del tiempo de reacción y tras varios ciclos de reacción reutilizando el correspondiente extracto lipásico. Los resultados obtenidos se recogen en las **Figuras 4.55 a 4.58**, donde se incluyen los resultados con un segundo cultivo de la misma cepa, lo que permite determinar la reproducibilidad del método, se trata de las muestras HR21-26b y HR21-65b.

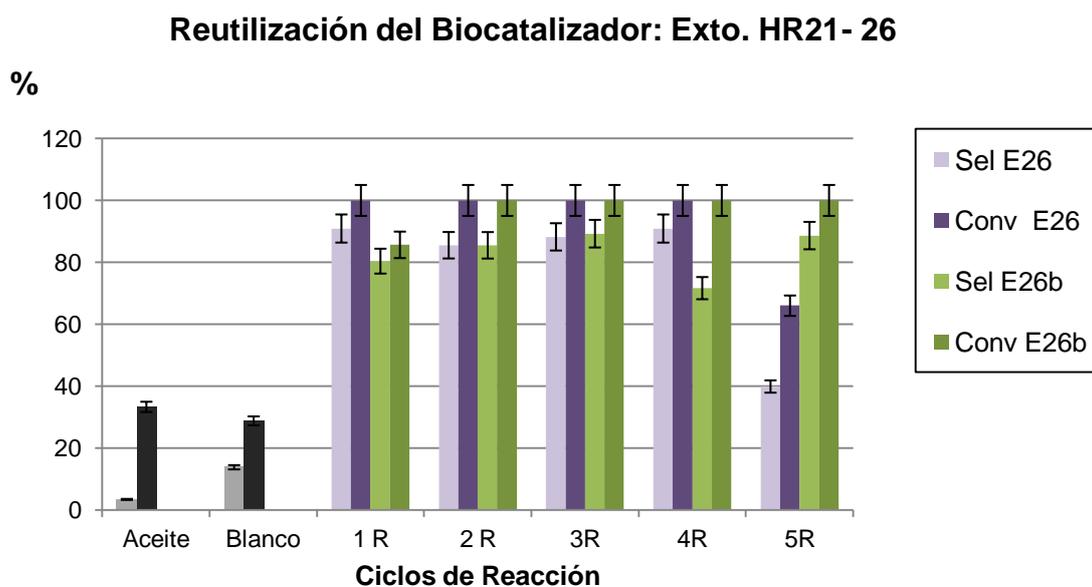


Figura 4.55. Rendimiento del extracto lipásico HR21- 26 en sucesivos ciclos de reacción operando a 37 °C, durante 24 horas, a 300 rpm, con 6 ml de aceite, 1.75 ml de etanol absoluto y 0.0125 ml de disolución acuosa de NaOH 10N). Los extractos se evalúan en un segundo cultivo, HR21- 26b.

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

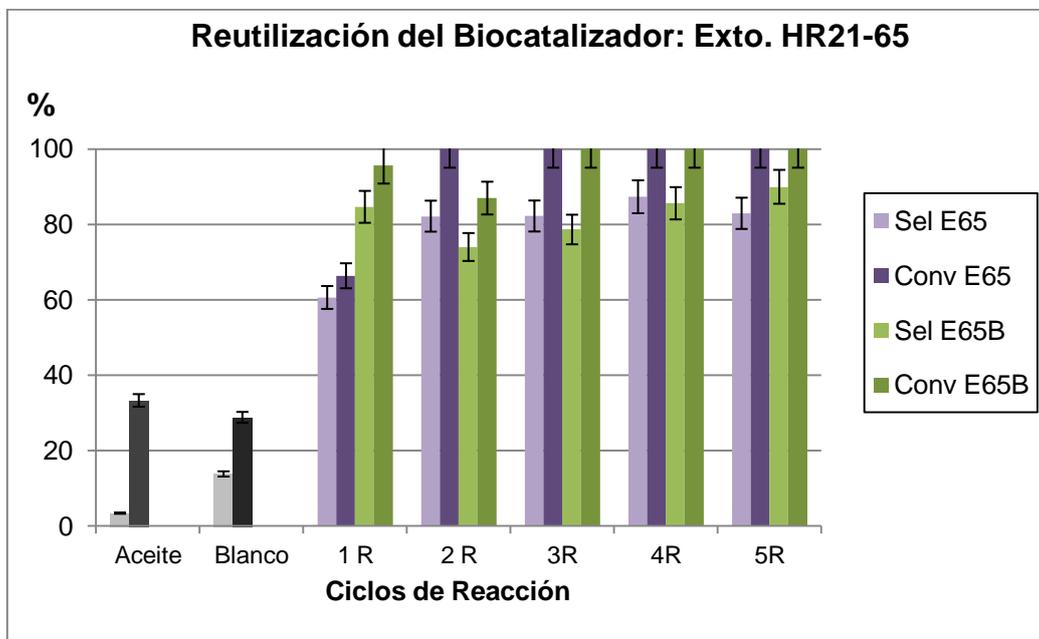


Figura 4.56. Rendimiento del extracto lipásico HR21- 65 en sucesivos ciclos de reacción operando a 37 °C, durante 24 horas, a 300 rpm, con 6 ml de aceite, 1.75 ml de etanol absoluto y 0.0125 ml de disolución acuosa de NaOH 10N). Los extractos se evalúan en un segundo cultivo, HR21- 65b.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto tanto la reproducibilidad del método empleado para obtener los extractos, como la capacidad de reutilización de dichos extractos, ya que en todos los casos se consiguen valores de Conversión próximos al 100% y de Selectividad en el entorno del 80%, independientemente del extracto empleado y del grado de reutilización efectuado. También hay que destacar los relativamente cortos tiempos de reacción necesarios para obtener los valores óptimos de conversión (**Figuras 4.57 y 4.58**), bastando 1-2 horas para conseguirlo, sea cual sea el ciclo de reutilización evaluado.

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

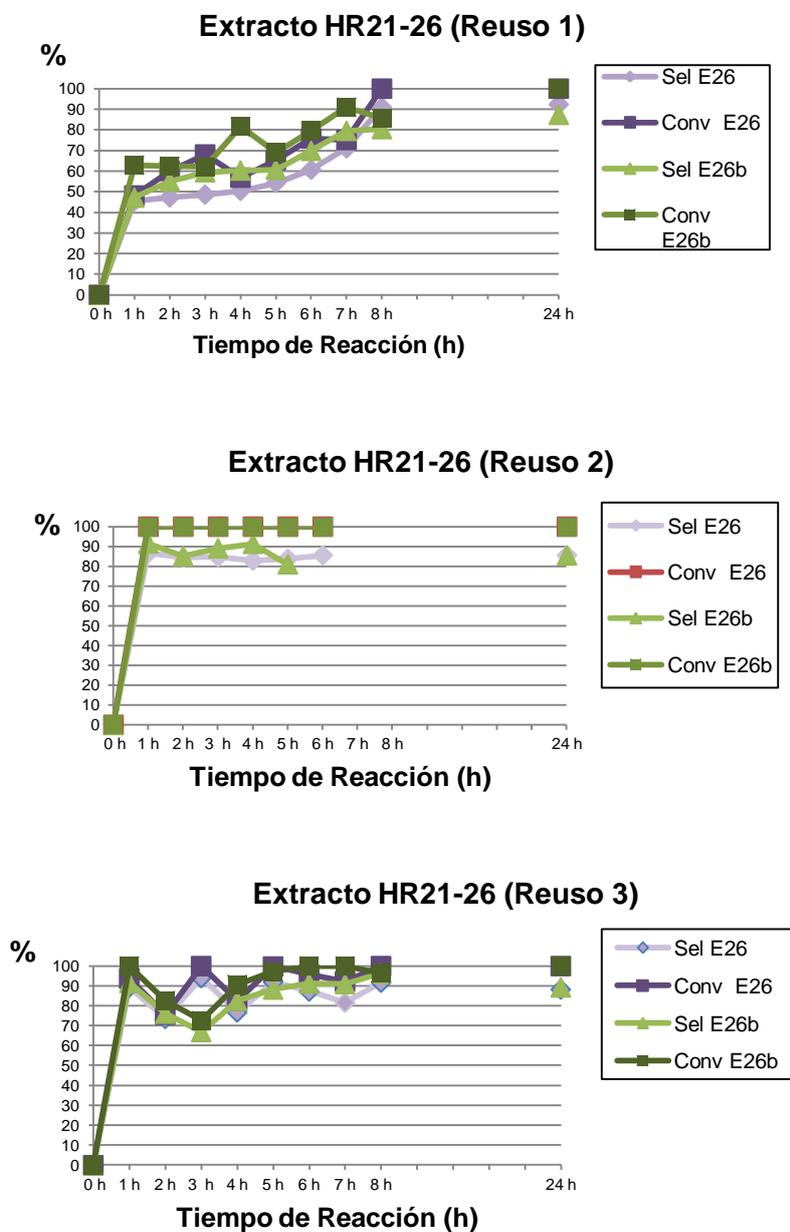


Figura 4.57. Rendimiento del extracto lipásico HR21-26 a lo largo del tiempo (cada 60 min.) en los tres primeros ciclos de reuso operando en condiciones estandar: 37 °C, 300 rpm, 6 ml de aceite, 1.75 ml etanol absoluto y 0.0125 ml de disolución acuosa de NaOH 10N. Los extractos se evalúan en un segundo cultivo, HR21- 26b.

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

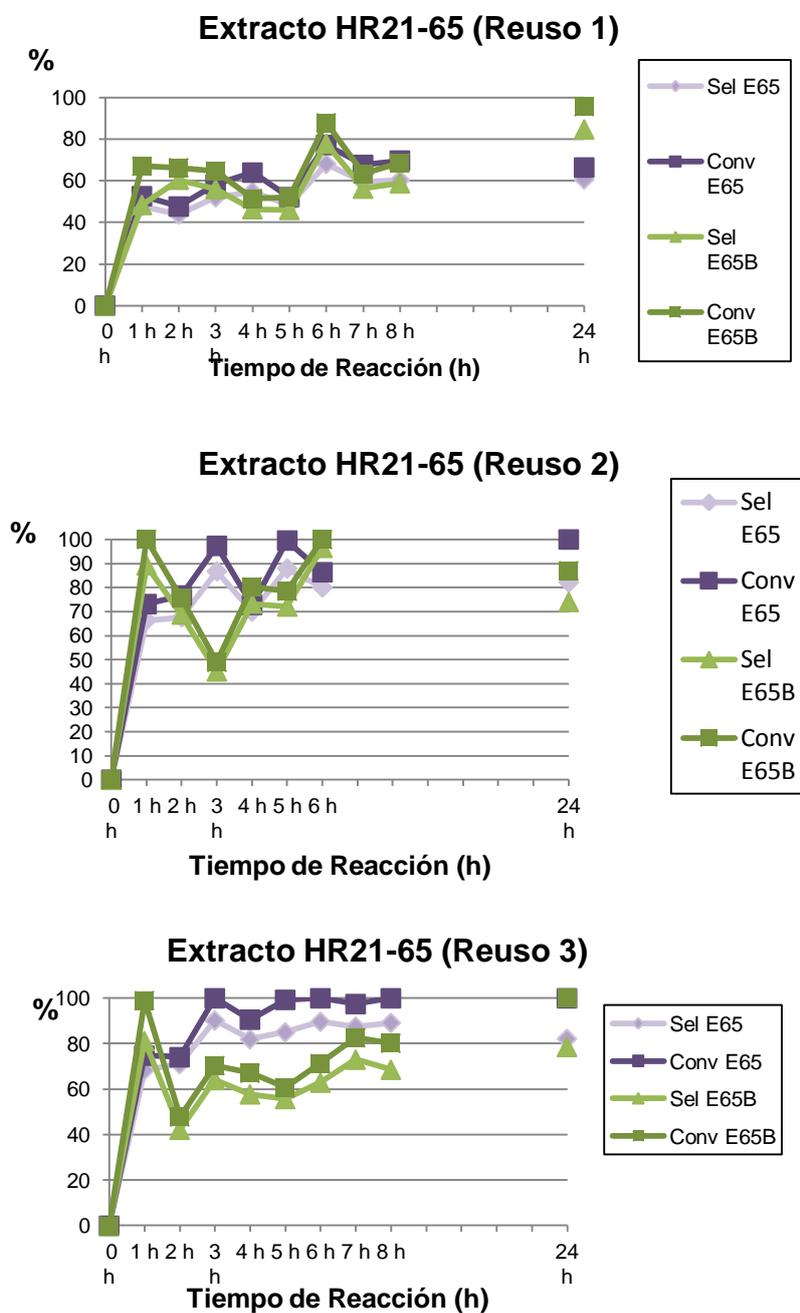


Figura 4.58. Rendimiento del extracto lipásico HR21-65 a lo largo del tiempo (cada 60 min.) en los tres primeros ciclos de reuso operando en condiciones estandar: 37 °C, 300 rpm, 6 ml de aceite, 1.75 ml etanol absoluto y 0.0125 ml de disolución acuosa de NaOH 10N. Los extractos se evalúan en un segundo cultivo, HR21- 65b.

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Podemos comprobar que la eficacia de ambas cepas HR21-65 y HR21-26 es bastante similar, de acuerdo con los resultados individuales recogidos en las **Figura 4.55** y **4.56**, agrupados en la en la misma gráfica, la **Figura 4.59** y los recogidos en las **Figura 4.57** y **4.58**, representados en la **Figura 4.60**.

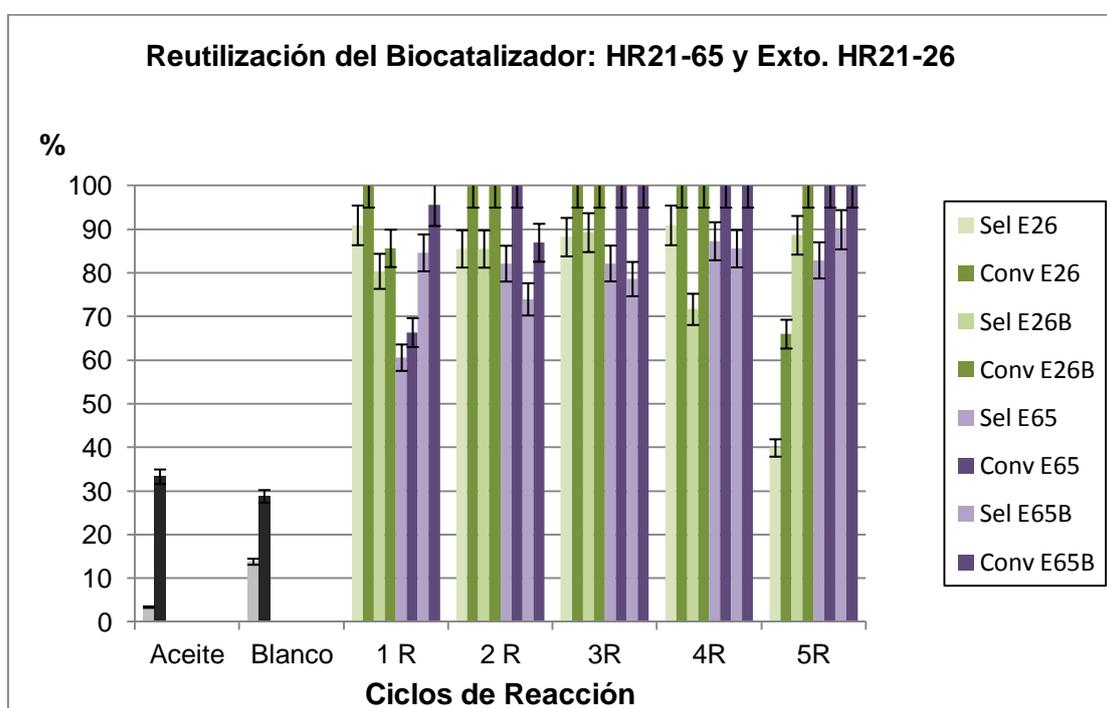


Figura 4.59. Rendimiento de los extractos lipásicos HR21-26 y HR21-65 operando en las mismas condiciones estándar de reacción, en sucesivos ciclos de reutilización, según los datos recogidos en las Figuras 4.55 y 4.56.

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

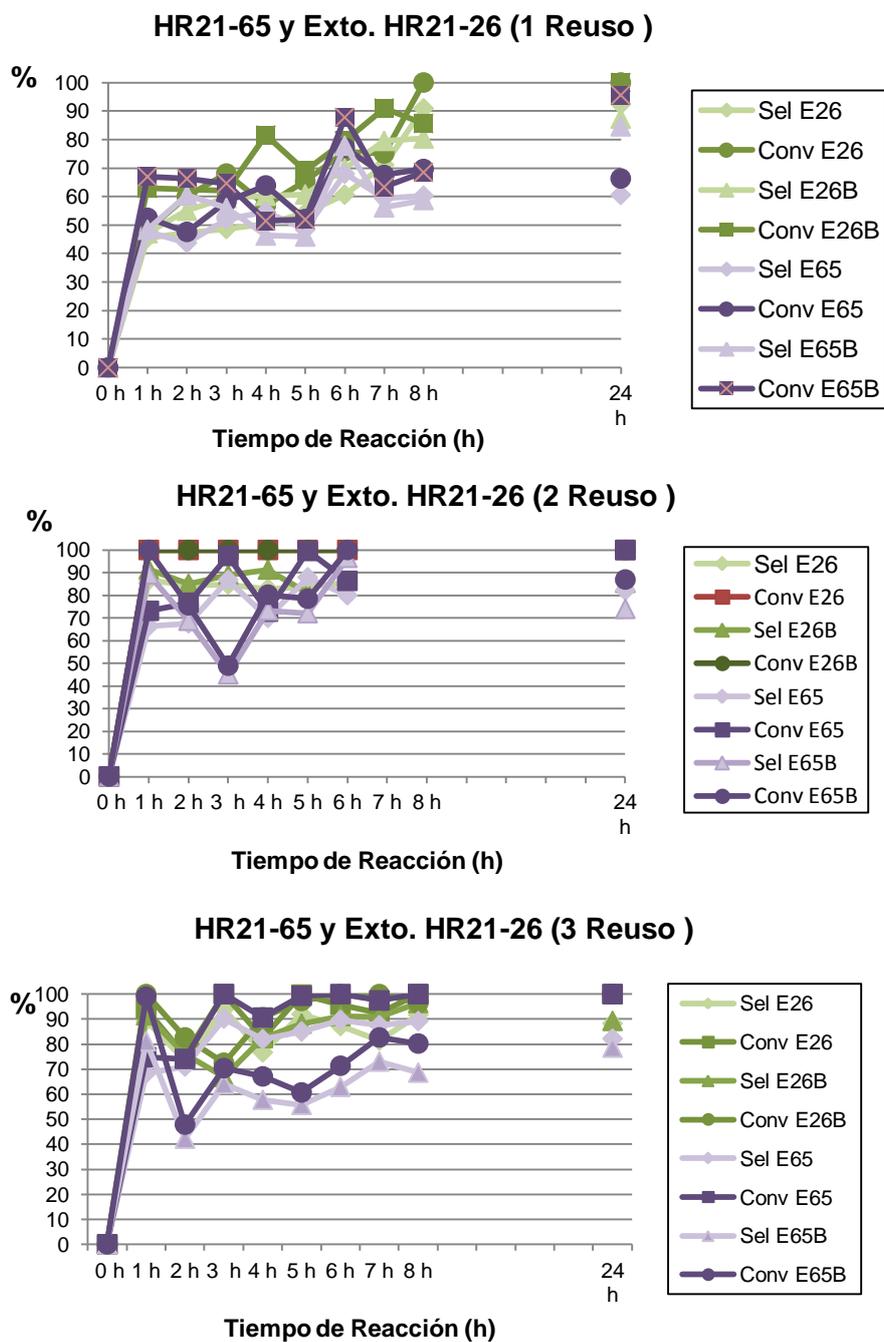


Figura 4.60. Rendimiento de los extractos lipásicos HR21-26 y HR21-65 a lo largo del tiempo (cada 60 min.), operando en las mismas condiciones estándar de reacción, en sucesivos ciclos de reusos, según los datos recogidos en las Figuras 4.57 y 4.58.

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

b) INFLUENCIA DE LAS diferentes condiciones y MEDIOS DE CULTIVO EN LA CALIDAD DE LOS EXTRACTOS LIPÁSICOS.

En este sentido, tras cultivar las mismas cepas (HR21-6, HR21-59, HR21-62, HR21-63) en dos medios diferentes (LB y PYA), se obtiene que el microorganismo produce un extracto enzimático más eficaz en el medio LB que en el medio PYA (Y.-G. Kim et al., 2007), a pesar que en el primer medio a las 48 h de su crecimiento se lisa y muere, con lo que lógicamente hay que proceder a su extracción antes de dicho tiempo (**Figura 4.60**). Estos resultados coinciden con los previamente descritos para las cepas de microorganismos extraídas de ambientes ricos en aceite vegetal.

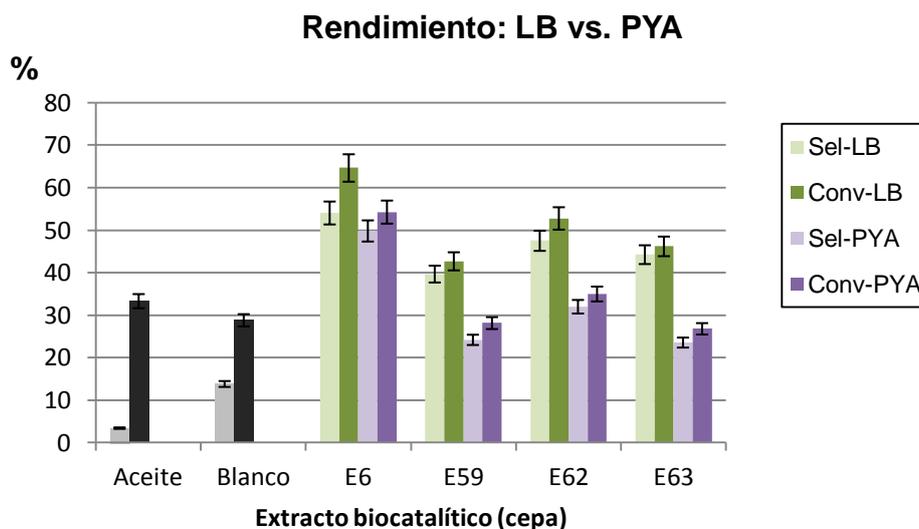


Figura 4.61. Resultados obtenidos en la transesterificación enzimática de aceite de girasol empleando un extracto lipásico liofilizado, previamente dializado, extraído de las muestras HR21-6, HR21-59, HR21-62 o HR21-63, habiendo crecido en diferentes medios y tiempos de cultivo. Medio LB con tributirina al 2% (72 h de crecimiento) o en Medio PYA sin tributirina, durante 48 h de crecimiento. Las condiciones de operación en la transesterificación, 37 °C, 24 horas, 300 rpm, 6 ml de aceite, 1.75 ml etanol absoluto y 0.0125 ml de disolución acuosa NaOH 10N.

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

c) CARACTERIZACIÓN FILOGENÉTICA DE LAS CEPAS MÁS EFICACES.

Para determinar que todas las cepas bacterianas aisladas en el muestreo con capacidad transesterificadora se encuadraban en el género *Bacillus*, se realizó una comparación de las secuencias parciales del ARNr 16S con las disponibles en las bases de datos cuando se empleó el programa BLAST (Altschul, Gish, Miller, Myers, & Lipman, 1990). En concreto, cada cepa analizada presentaba una elevada similitud con gran variedad de especies de este género, por ello, y para facilitar su filogenia, se procedió a localizar cepas de los representantes más destacados y con mayor índice de identidad (entre 99 y 100%), y tras la construcción del árbol filogenético se determinó que 13 cepas se ajustaban al taxón en el que se encuentra *Bacillus stratosphericus* GD65; 5 de ellas mostraron un alto índice de similitud con dos bacterias del mismo taxón, *Bacillus aerophilus* strain 28K y *Bacillus altitudinis* type strain 41KF26; una cepa quedó emparentada con la especie *Bacillus aerius* strain 24K, y una restante, aunque claramente perteneciente al género *Bacillus*, no mostró un porcentaje de identidad concluyente a ninguna de las cepas tipo atribuidas. Debemos indicar que el árbol filogenético fue construido utilizando secuencias parciales de 614 pb, por lo que no se puede afirmar con rotundidad la identidad de estas cepas con las filogenéticamente relacionadas. Para una mayor concreción en los resultados se deberá proceder a la analizar la secuencia completa del ARNr.

Según el análisis del ARN ribosómico 16S (**Figura 3.63**), las cepas que obtuvieron mejores valores en la producción de biodiésel (HR21.65 y HR21.59) se incluyen en el género *Bacillus* y están relacionadas con las cepas *Bacillus stratosphericus* strain GD65 y con, *Bacillus aerophilus* strain 28K y *Bacillus altitudinis* 41KF26 respectivamente. Estas cepas resultaron ser las que mayor actividad transesterificadora poseían, ya que la reacción de transesterificación de aceite de girasol y etanol mediante catálisis enzimática se efectuó con un alto porcentaje de

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

conversión al biocombustible Ecodiésel, con un 90,04% para el biocatalizador constituido por el extracto HR21.65 y 100% para HR21.59. Esto unido a la baja proporción de DG y TG restantes en la muestra y a una viscosidad relativamente baja, apropiada para el uso en motores, hacen de estas cepas candidatas a ser empleadas en la producción de biodiésel a escala industrial.

De toda la diversidad microbiana que habita el suelo, sólo unos pocos géneros bacterianos han demostrado que son capaces de producir el biocombustible Ecodiésel. De entre estos géneros, en este estudio se ha puesto de manifiesto la superior capacidad transesterificadora del género *Bacillus*. Este género *Bacillus* está integrado por una gran diversidad de bacterias Gram positivas ampliamente estudiadas, poseen una morfología de bacilo y bajo condiciones ambientales adversas forman endosporas muy resistentes, las cuales sobreviven al calor, luz ultravioleta, desecación y solventes orgánicos.

Las características de determinadas cepas de *Bacillus* que producen y secretan grandes cantidades de enzimas extracelulares hacen que sean consideradas uno de los productores más importantes de enzimas industriales (Hasan, Shah, & Hameed, 2006). Así mismo, la habilidad de diferentes especies de este género de fermentar en amplios rangos de pH que van del ácido, neutro, y alcalino, combinado con la presencia de algunas especies termófilas, ha permitido el desarrollo de una gran variedad de productos enzimáticos nuevos, comerciales, desarrollados a temperaturas y pH óptimos de actividad, y estabilidad para hacer frente a una variedad de aplicaciones específicas (Schallmey, Singh, & Ward, 2004).

Actualmente se han descrito diversas lipasas provenientes de fuentes microbianas, pero aún falta por explorar una gran diversidad de microorganismos que permitirán obtener enzimas con características diferentes. Las lipasas bacterianas son en su mayoría extracelulares. Algunos géneros bacterianos descritos como

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

productores de lipasas incluye a *Pseudomonas*, *Staphylococcus* (Jaeger, Dijkstra, & Reetz, 1999) y *Bacillus* (KhyamiHorani, 1996; Lesuisse, Schanck, & Colson, 1993). Bradoo (1999) por su parte, señaló a tres especies de *Bacillus* como potenciales productores de lipasas termotolerantes: *B. stearothermophilus*, *B. atrophaeus*, y *B. licheniformis* (Bradoo, Saxena, & Gupta, 1999).

d) ESTUDIO DE LA CEPA HR21-6 (G. BACILLUS).

A fin de optimizar la producción de una de las cepas más eficaces, la HR21-6, perteneciente al G. *Bacillus*, se realiza un estudio de crecimiento comparando los medios de cultivo, LB vs. PYA (con y sin tributirina), donde la cepa ha sido cultivada con diferentes tiempos de crecimiento en cada uno de ellos (48 h y 72 h). Los cuatro tipos de cepa, en función de ambos tipos de medios y ambos tiempos de crecimiento, son evaluadas en la reacción de etanolísis, operando en condiciones estándar, estudiándose la evolución del rendimiento a lo largo del tiempo de reacción, así como la estabilidad del extracto lipásico empleado como biocatalizador, al ser reutilizado en 10 ciclos de reacción. Los resultados obtenidos son mostrados en las **Figuras 4.62, 4.63 y 4.64.**

A tenor de estos resultados, es más conveniente para obtener un extracto lipásico lo más adecuado posible, realizar el cultivo durante 48 h en medio LB.

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Optimización de la cepa HR21-6 (*G. Bacillus*)

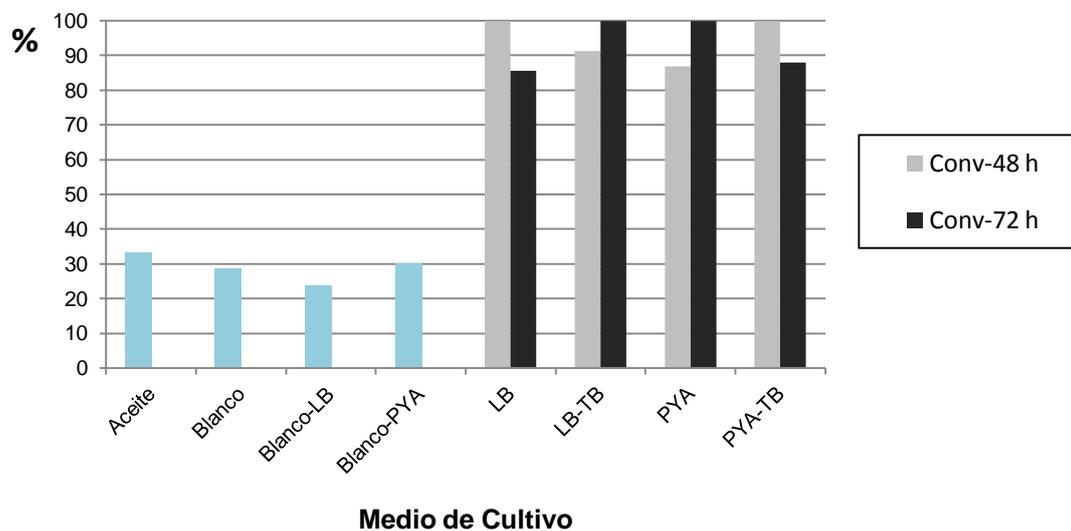
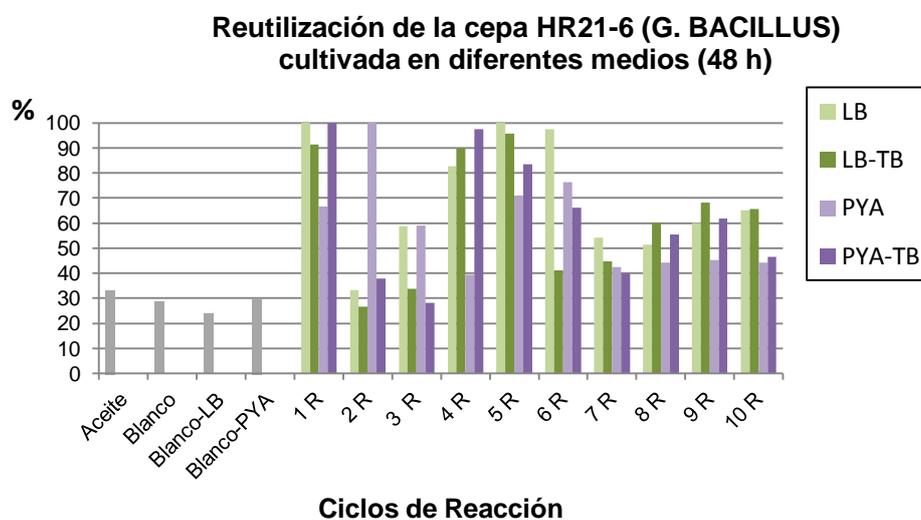


Figura 4.62. Rendimiento del extracto lipásico de la cepa HR21-6 (*G. Bacillus*), producida en diferentes medios de cultivo (LB, PYA) con y sin tributirina, durante 48 h o 72 h, obtenidos por un proceso de purificación simple (diálisis y liofilización) operando en las condiciones de reacción estándar.

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

(a)



(b)

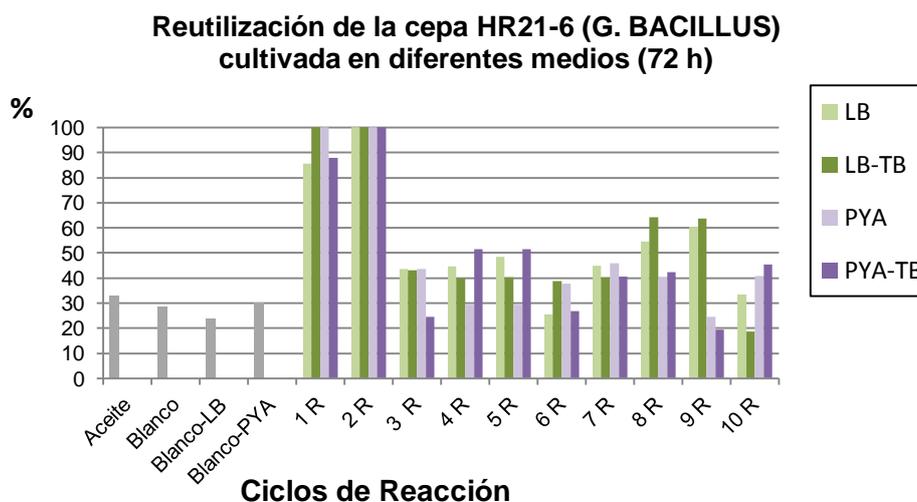
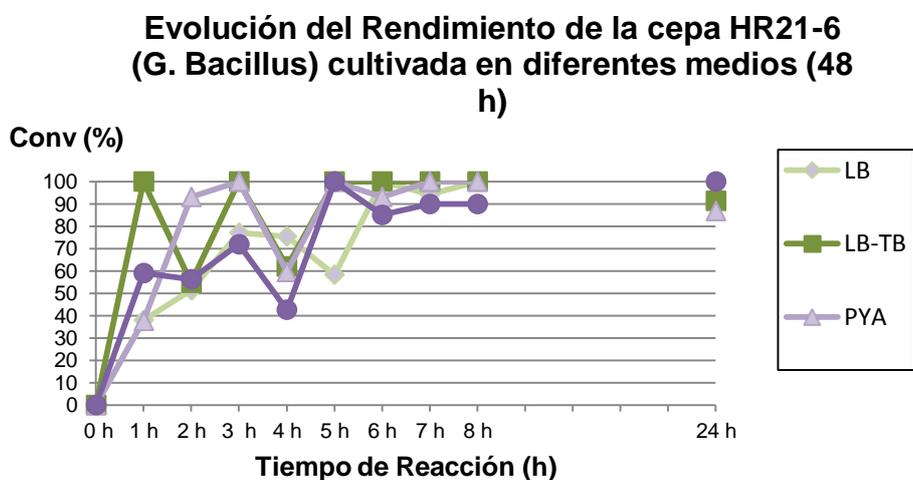


Figura 4.63. Rendimiento a lo largo de los diferentes ciclos de reuso del extracto lipásico de la cepa HR21-6 (*G. Bacillus*), cultivada en diferentes medios de cultivo (LB, PYA) con y sin tributirina, durante 48 h (a) o 72 h (b), obtenidos por un proceso de purificación simple (diálisis y liofilización) y operando en las condiciones de reacción estándar.

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

(a)



(b)

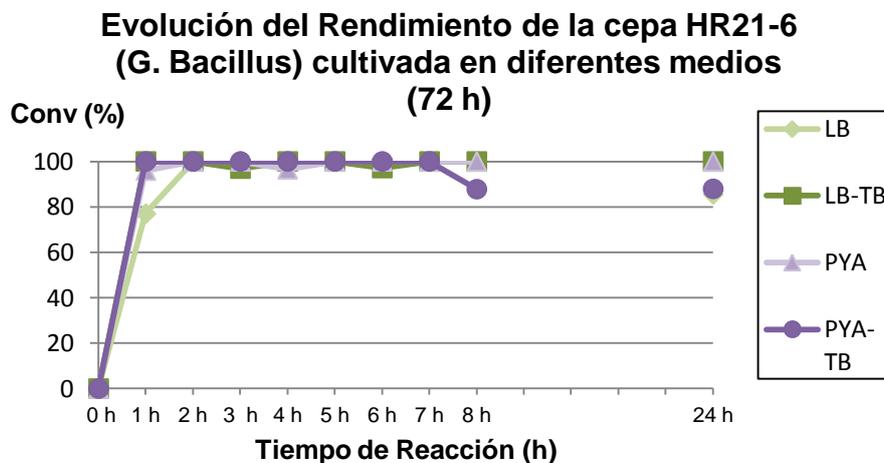


Figura 4.64. Evolución del Rendimiento a lo largo del tiempo de reacción del extracto lipásico de la cepa HR21-6 (G. Bacillus), cultivada en diferentes medios de cultivo (LB, PYA) con y sin tributirina, durante 48 h (a) o 72 h (b), obtenidos por un proceso de purificación simple (diálisis y liofilización) y operando en las condiciones de reacción estándar.

4.3.2. CEPAS MICROBIANAS SILVESTRES RECOLECTADAS EN AMBIENTES CON GRASA ANIMAL.

De las 3.103 cepas bacterianas y 952 cepas fúngicas aisladas de tres muestras diferentes recogidas en ambientes con grasa animal, utilizando diferentes medios de cultivo y temperaturas, fueron seleccionados para realizar un análisis más prolijo 20 bacterias y 3 hongos. Debido a la baja conversión que presentan los hongos estudiados (**Tabla 3.52**), este análisis se centra en el grupo de microorganismos bacterianos. Los resultados obtenidos indican que la mayoría de las cepas bacterianas presentan una eficiencia (Selectividad o porcentaje relativo de FAEE+MG) comprendida entre el 20 y 80 %. Por encima de este valor sólo encontramos las cepas HR21.6, HR21.59, HR21.62B, HR21.63, HR21.63B y HR21.65. De entre éstas, sólo dos de ellas consiguen más de un 90% de Conversión y Selectividad las HR21.65 y HR21.59, respectivamente, como se puede comprobar en la **Tabla 3.58**, a partir de la cual podemos adquirir una visión de conjunto, en la **Figura 4.53**, respecto a la proporción relativa de cepas que presenta un porcentaje de rendimiento determinado.

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

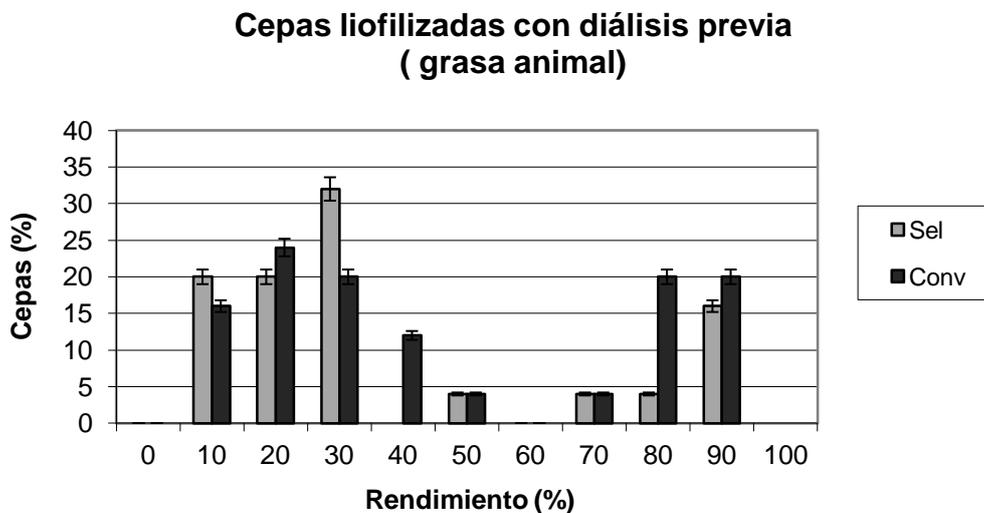


Figura 4.53. Distribución del rendimiento del total de los extractos lipásicos, obtenidos por liofilización y diálisis previa, a partir de cultivos líquidos de cepas procedentes de ambientes con grasas animales (serrín de pescado) (20 cepas bacterianas).

En conjunto, si comparamos la eficacia de los extractos aislados de los entornos con aceites vegetales con la de aquellos extraídos de ambientes con grasas animales (**Figuras 4.41 y 4.53**) podemos concluir que los extractos procedentes de cepas extraídas de ambientes con grasa animal tienen un rendimiento global aceptable, pero claramente inferior a los resultados obtenidos con los extractos originarios de ambientes con aceite vegetal, como se aprecia en la **Figura 4.54**, donde se puede comprobar que mientras el 35% de cepas de ambientes vegetales alcanza un 90 % de Conversión, sólo un 20% de las cepas de entornos de grasa animal alcanza este valor de Conversión.

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

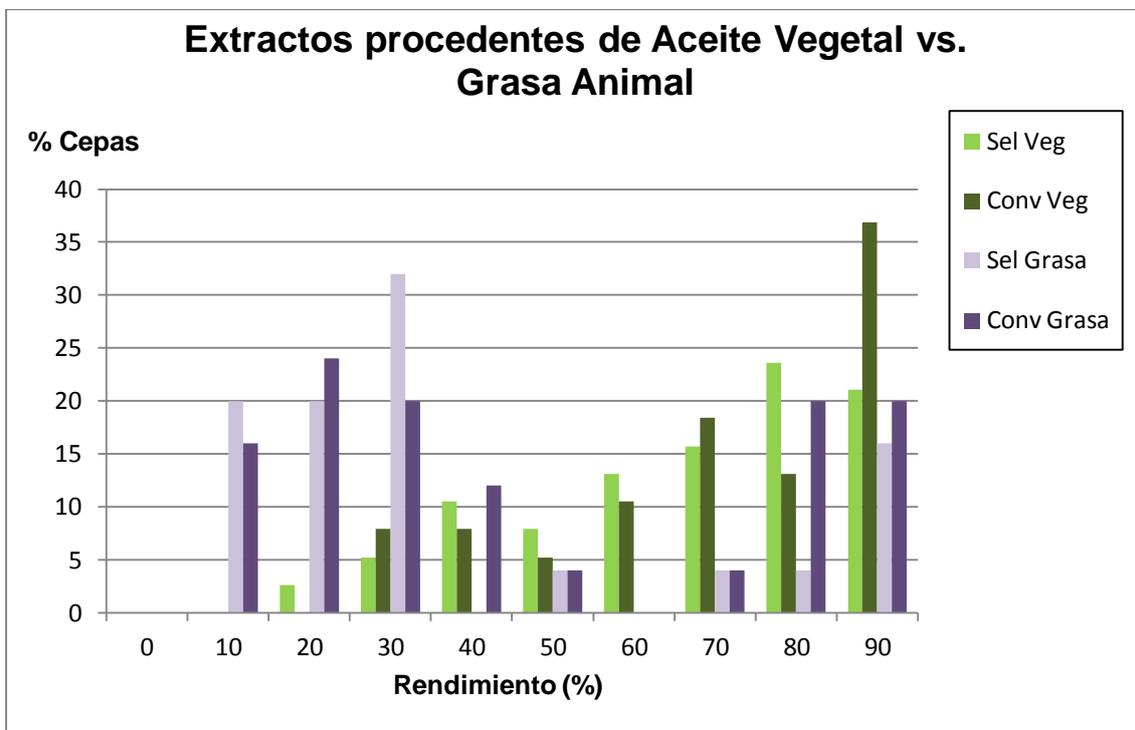


Figura 4.54. Distribución del rendimiento del total de los extractos lipásicos, obtenidos por liofilización y diálisis previa, a partir de cultivos líquidos de cepas procedentes de ambientes con aceites vegetales (30 cepas bacterianas) y de ambientes con grasas animales (serrín de pescado) (20 cepas bacterianas).

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

a) ESTUDIO DEL RENDIMIENTO DE LAS CEPAS MÁS EFICACES RECOLECTADAS EN AMBIENTES CON GRASA ANIMAL.

Para evaluar adecuadamente las cepas más eficientes, HR21-26 y HR21-65 respectivamente, se procede a determinar la evolución del rendimiento a lo largo del tiempo de reacción y tras varios ciclos de reacción reutilizando el correspondiente extracto lipásico. Los resultados obtenidos se recogen en las **Figuras 4.55 a 4.58**, donde se incluyen los resultados obtenidos con un segundo cultivo, lo que permite determinar la reproducibilidad del método, se trata de las muestras HR21-26b y HR21-65b.

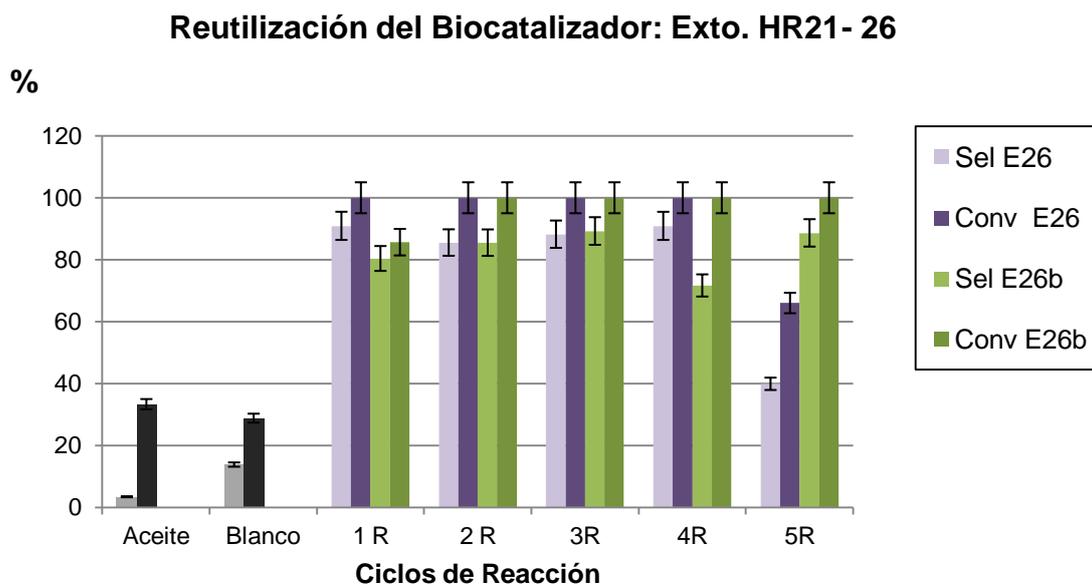


Figura 4.55. Rendimiento del extracto lipásico HR21- 26 en sucesivos ciclos de reacción operando a 37 °C, durante 24 horas, a 300 rpm, con 6 ml de aceite, 1.75 ml de etanol absoluto y 0.0125 ml de disolución acuosa de NaOH 10N). Los extractos se evalúan en un segundo cultivo, HR21- 26b.

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

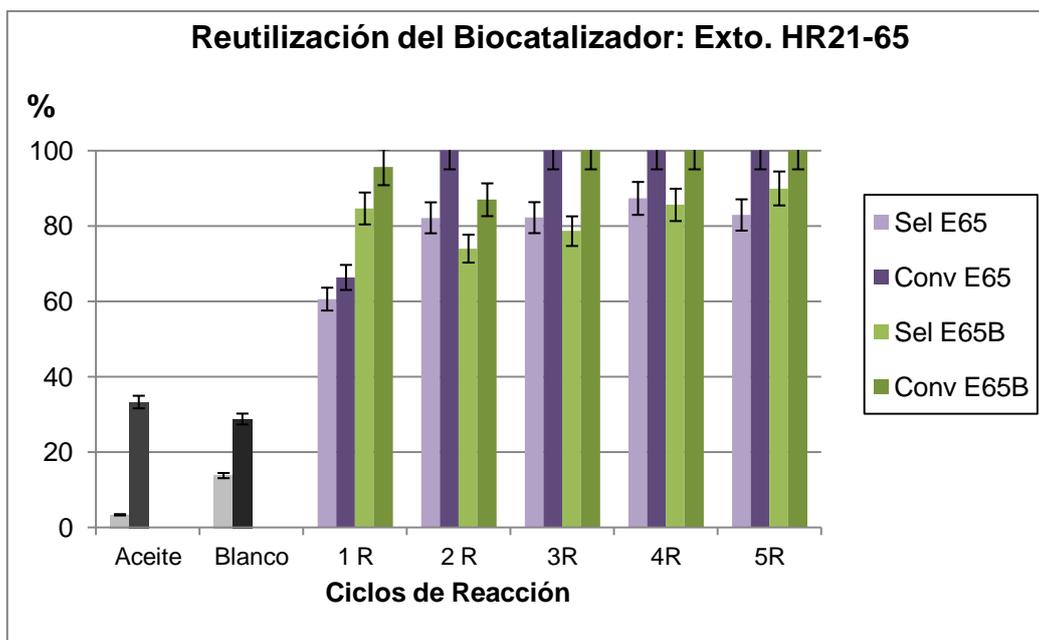


Figura 4.56. Rendimiento del extracto lipásico HR21- 65 en sucesivos ciclos de reacción operando a 37 °C, durante 24 horas, a 300 rpm, con 6 ml de aceite, 1.75 ml de etanol absoluto y 0.0125 ml de disolución acuosa de NaOH 10N). Los extractos se evalúan en un segundo cultivo, HR21- 65b.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto tanto la reproducibilidad del método empleado para obtener los extractos, como la capacidad de reutilización de dichos extractos, ya que en todos los casos se consiguen valores de Conversión próximos al 100% y de Selectividad en el entorno del 80%, independientemente del extracto empleado y del grado de reutilización efectuado. También hay que destacar los relativamente cortos tiempos de reacción necesarios para obtener los valores óptimos de conversión (**Figuras 4.57 y 4.58**), bastando 1-2 horas para conseguirlo, sea cual sea el ciclo de reutilización evaluado.

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

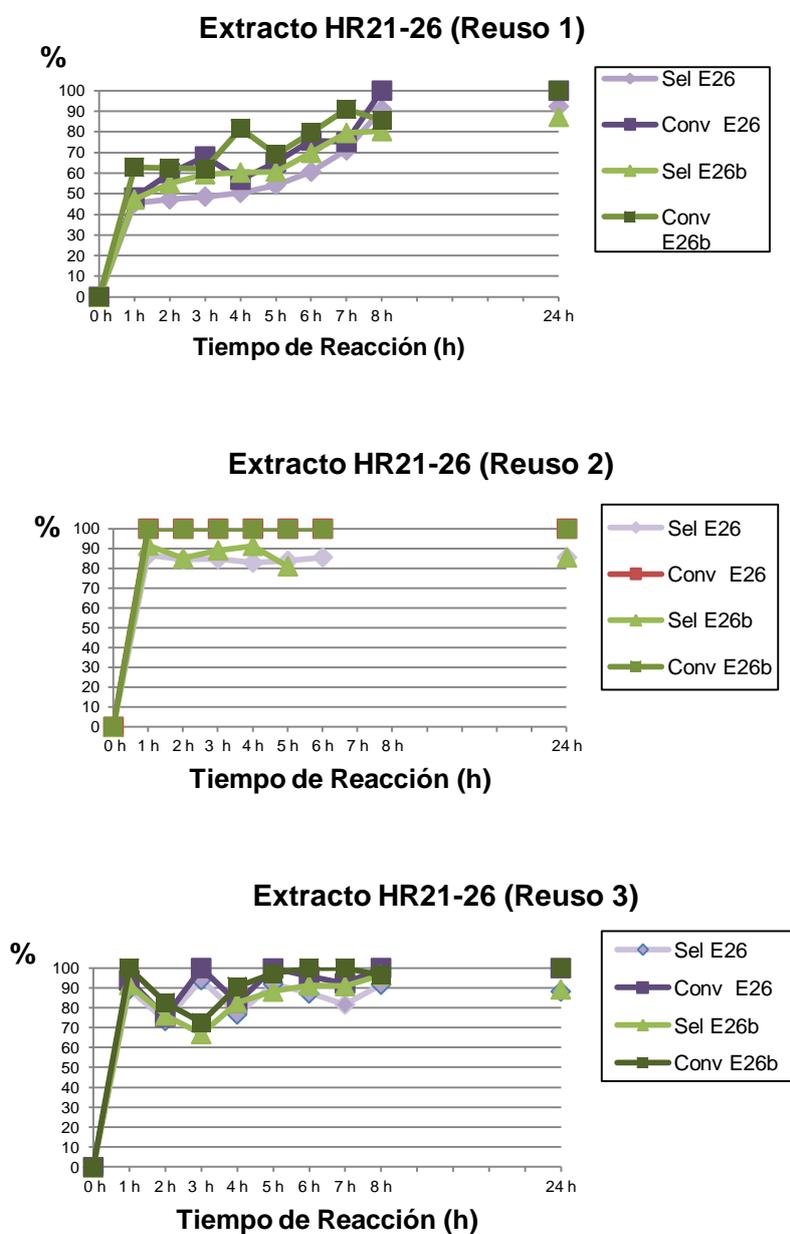


Figura 4.57. Rendimiento del extracto lipásico HR21-26 a lo largo del tiempo (cada 60 min.) en los tres primeros ciclos de reuso operando en condiciones estandar: 37 °C, 300 rpm, 6 ml de aceite, 1.75 ml etanol absoluto y 0.0125 ml de disolución acuosa de NaOH 10N. Los extractos se evalúan en un segundo cultivo, HR21- 26b.

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

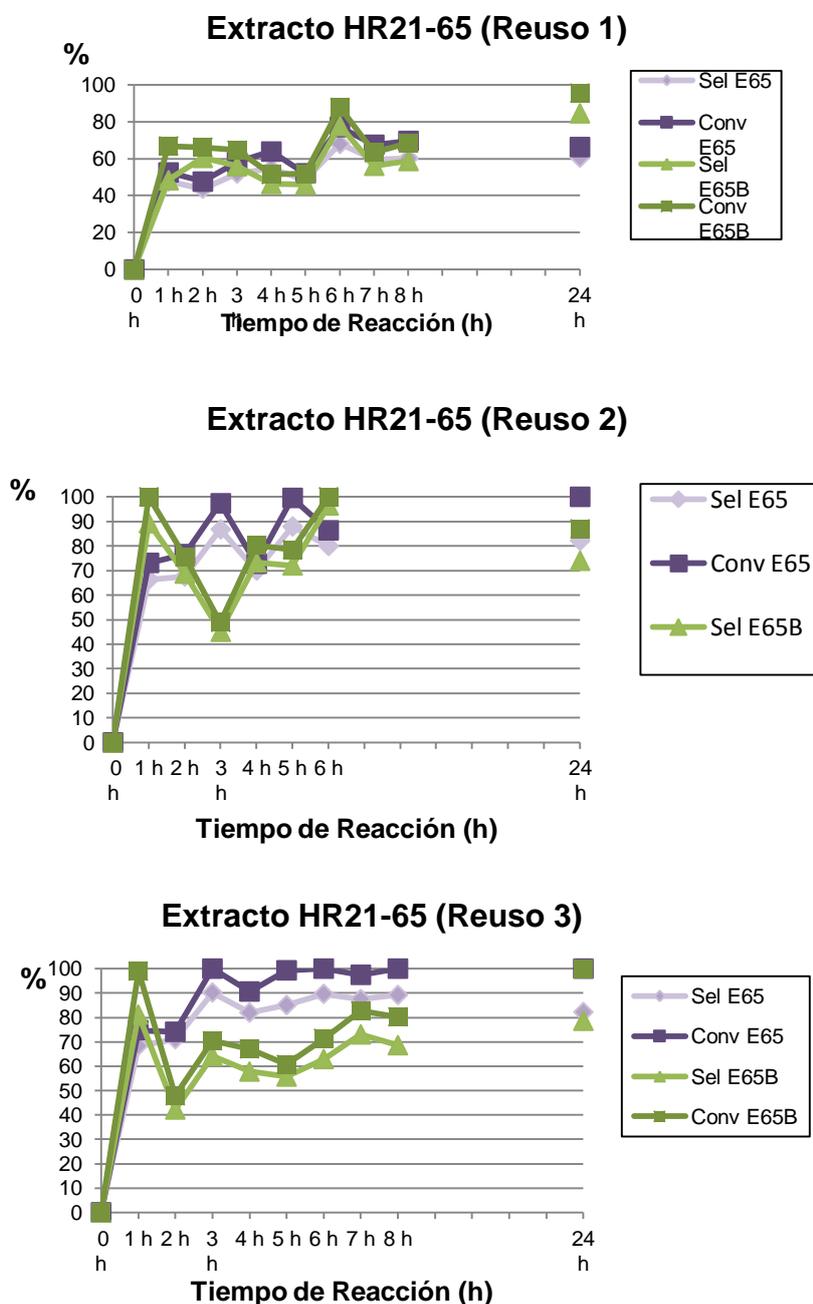


Figura 4.58. Rendimiento del extracto lipásico HR21-65 a lo largo del tiempo (cada 60 min.) en los tres primeros ciclos de reuso operando en condiciones estandar: 37 °C, 300 rpm, 6 ml de aceite, 1.75 ml etanol absoluto y 0.0125 ml de disolución acuosa de NaOH 10N. Los extractos se evalúan en un segundo cultivo, HR21- 65b.

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Podemos comprobar que la eficacia de ambas cepas HR21-65 y HR21-26 es bastante similar, de acuerdo con los resultados individuales recogidos en las **Figura 4.55** y **4.56**, agrupados en la en la misma gráfica, la **Figura 4.59** y los recogidos en las **Figura 4.57** y **4.58**, representados en la **Figura 4.60**.

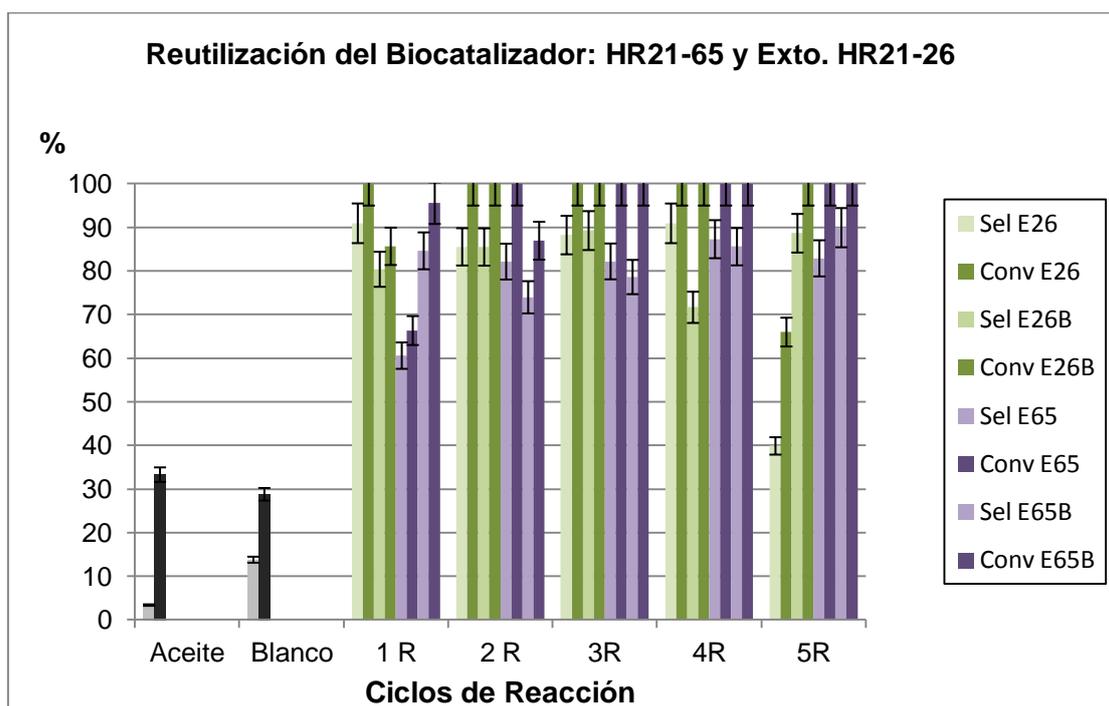


Figura 4.59. Rendimiento de los extractos lipásicos HR21-26 y HR21-65 operando en las mismas condiciones estándar de reacción, en sucesivos ciclos de reutilización, según los datos recogidos en las Figuras 4.55 y 4.56.

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

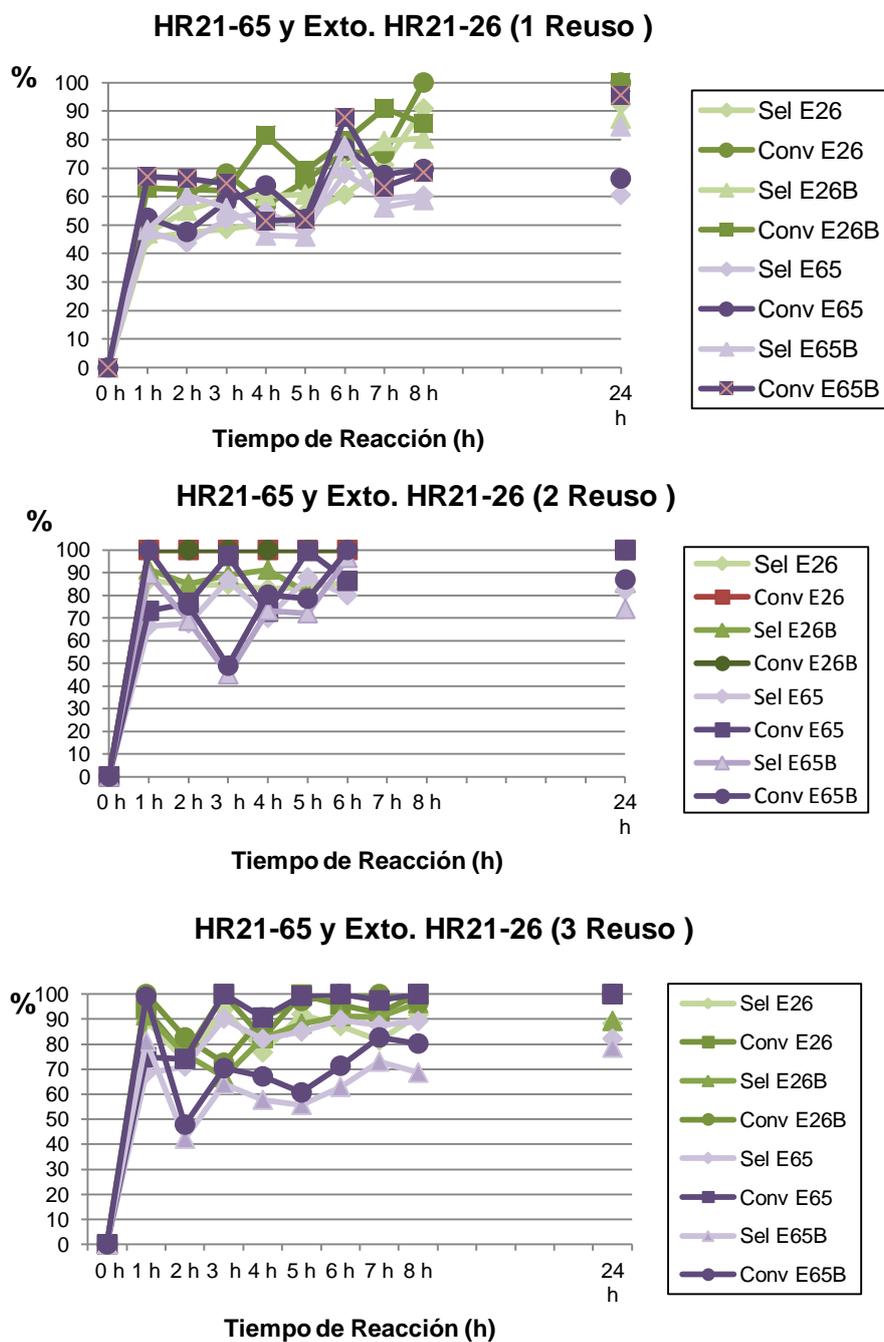


Figura 4.60. Rendimiento de los extractos lipásicos HR21-26 y HR21-65 a lo largo del tiempo (cada 60 min.), operando en las mismas condiciones estándar de reacción, en sucesivos ciclos de reusos, según los datos recogidos en las Figuras 4.57 y 4.58.

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

b) INFLUENCIA DE LAS DIFERENTES CONDICIONES y MEDIOS DE CULTIVO EN LA CALIDAD DE LOS EXTRACTOS LIPÁSICOS.

En este sentido, tras cultivar las mismas cepas (HR21-6, HR21-59, HR21-62, HR21-63) en dos medios diferentes (LB y PYA), se obtiene que el microorganismo produce un extracto enzimático más eficaz en el medio LB que en el medio PYA (Y.-G. Kim et al., 2007), a pesar que en el primer medio a las 48 h de su crecimiento se lisa y muere, con lo que lógicamente hay que proceder a su extracción antes de dicho tiempo (**Figura 4.60**). Estos resultados coinciden con los previamente descritos para las cepas de microorganismos extraídas de ambientes ricos en aceite vegetal.

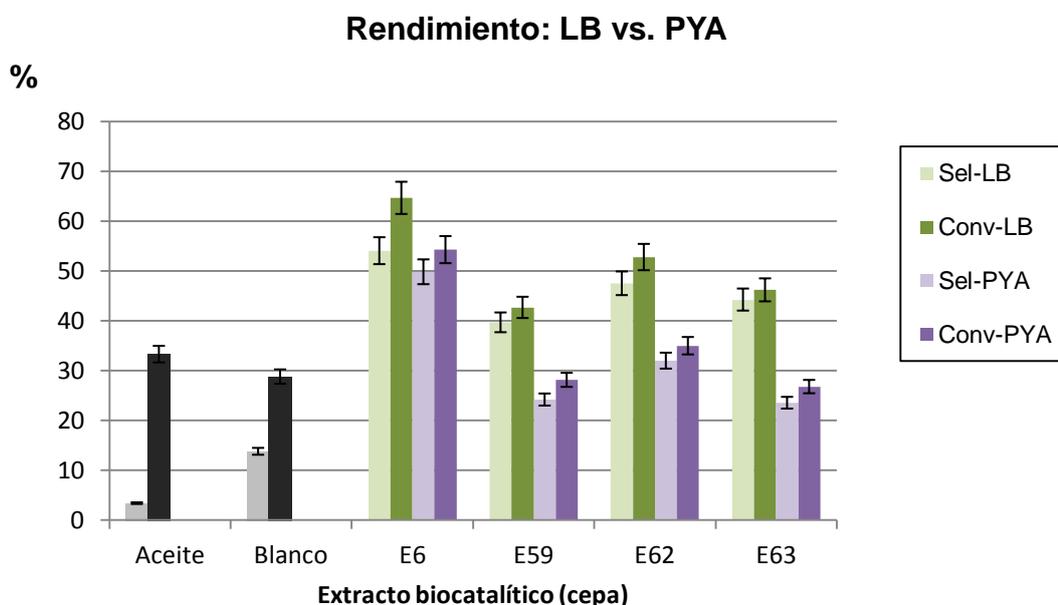


Figura 4.61. Resultados obtenidos en la transesterificación enzimática de aceite de girasol empleando un extracto lipásico liofilizado, previamente dializado, extraído de las muestras HR21-6, HR21-59, HR21-62 o HR21-63, habiendo crecido en diferentes medios y tiempos de cultivo. Medio LB con tributirina al 2% (72 h de crecimiento) o en Medio PYA sin tributirina, durante 48 h de crecimiento. Las condiciones de operación en la transesterificación, 37 °C, 24 horas, 300 rpm, 6 ml de aceite, 1.75 ml etanol absoluto y 0.0125 ml de disolución acuosa NaOH 10N.

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

c) CARACTERIZACIÓN FILOGENÉTICA DE LAS CEPAS MÁS EFICACES.

Para determinar que todas las cepas bacterianas aisladas en el muestreo con capacidad transesterificadora se encuadraban en el género *Bacillus*, se realizó una comparación de las secuencias parciales del ARNr 16S con las disponibles en las bases de datos cuando se empleó el programa BLAST (Altschul, Gish, Miller, Myers, & Lipman, 1990). En concreto, cada cepa analizada presentaba una elevada similitud con gran variedad de especies de este género, por ello, y para facilitar su filogenia, se procedió a localizar cepas de los representantes más destacados y con mayor índice de identidad (entre 99 y 100%), y tras la construcción del árbol filogenético se determinó que 13 cepas se ajustaban al taxón en el que se encuentra *Bacillus stratosphericus* GD65; 5 de ellas mostraron un alto índice de similitud con dos bacterias del mismo taxón, *Bacillus aerophilus* strain 28K y *Bacillus altitudinis* type strain 41KF26; una cepa quedó emparentada con la especie *Bacillus aerius* strain 24K, y una restante, aunque claramente perteneciente al género *Bacillus*, no mostró un porcentaje de identidad concluyente a ninguna de las cepas tipo atribuidas. Debemos indicar que el árbol filogenético fue construido utilizando secuencias parciales de 614 pb, por lo que no se puede afirmar con rotundidad la identidad de estas cepas con las filogenéticamente relacionadas. Para una mayor concreción en los resultados se deberá proceder a la analizar la secuencia completa del ARNr.

Según el análisis del ARN ribosómico 16S (**Figura 3.63**), las cepas que obtuvieron mejores valores en la producción de biodiésel (HR21.65 y HR21.59) se incluyen en el género *Bacillus* y están relacionadas con las cepas *Bacillus stratosphericus* strain GD65 y con, *Bacillus aerophilus* strain 28K y *Bacillus altitudinis* 41KF26 respectivamente. Estas cepas resultaron ser las que mayor actividad transesterificadora poseían, ya que la reacción de transesterificación de aceite de girasol y etanol mediante catálisis enzimática se efectuó con un alto porcentaje de

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

conversión al biocombustible Ecodiésel, con un 90,04% para el biocatalizador constituido por el extracto HR21.65 y 100% para HR21.59. Esto unido a la baja proporción de DG y TG restantes en la muestra y a una viscosidad relativamente baja, apropiada para el uso en motores, hacen de estas cepas candidatas a ser empleadas en la producción de biodiésel a escala industrial.

De toda la diversidad microbiana que habita el suelo, sólo unos pocos géneros bacterianos han demostrado que son capaces de producir el biocombustible Ecodiésel. De entre estos géneros, en este estudio se ha puesto de manifiesto la superior capacidad transesterificadora del género *Bacillus*. Este género *Bacillus* está integrado por una gran diversidad de bacterias Gram positivas ampliamente estudiadas, poseen una morfología de bacilo y bajo condiciones ambientales adversas forman endosporas muy resistentes, las cuales sobreviven al calor, luz ultravioleta, desecación y solventes orgánicos.

Las características de determinadas cepas de *Bacillus* que producen y secretan grandes cantidades de enzimas extracelulares hacen que sean consideradas uno de los productores más importantes de enzimas industriales (Hasan, Shah, & Hameed, 2006). Así mismo, la habilidad de diferentes especies de este género de fermentar en amplios rangos de pH que van del ácido, neutro, y alcalino, combinado con la presencia de algunas especies termófilas, ha permitido el desarrollo de una gran variedad de productos enzimáticos nuevos, comerciales, desarrollados a temperaturas y pH óptimos de actividad, y estabilidad para hacer frente a una variedad de aplicaciones específicas (Schallmey, Singh, & Ward, 2004).

Actualmente se han descrito diversas lipasas provenientes de fuentes microbianas, pero aún falta por explorar una gran diversidad de microorganismos que permitirán obtener enzimas con características diferentes. Las lipasas bacterianas son en su mayoría extracelulares. Algunos géneros bacterianos descritos como

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

productores de lipasas incluye a *Pseudomonas*, *Staphylococcus* (Jaeger, Dijkstra, & Reetz, 1999) y *Bacillus* (KhyamiHorani, 1996; Lesuisse, Schanck, & Colson, 1993). Bradoo (1999) por su parte, señaló a tres especies de *Bacillus* como potenciales productores de lipasas termotolerantes: *B. stearothermophilus*, *B. atrophaeus*, y *B. licheniformis* (Bradoo, Saxena, & Gupta, 1999).

d) ESTUDIO DE LA CEPA HR21-6 (G. BACILLUS).

A fin de optimizar la producción de una de las cepas más eficaces, la HR21-6, perteneciente al G. *Bacillus*, se realiza un estudio de crecimiento comparando los medios de cultivo, LB vs. PYA (con y sin tributirina), donde la cepa ha sido cultivada con diferentes tiempos de crecimiento en cada uno de ellos (48 h y 72 h). Los cuatro tipos de cepa, en función de ambos tipos de medios y ambos tiempos de crecimiento, son evaluadas en la reacción de etanolísis, operando en condiciones estándar, estudiándose la evolución del rendimiento a lo largo del tiempo de reacción, así como la estabilidad del extracto lipásico empleado como biocatalizador, al ser reutilizado en 10 ciclos de reacción. Los resultados obtenidos son mostrados en las **Figuras 4.62, 4.63 y 4.64.**

A tenor de estos resultados, es más conveniente para obtener un extracto lipásico lo más adecuado posible, realizar el cultivo durante 48 h en medio LB.

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Optimización de la cepa HR21-6 (*G. Bacillus*)

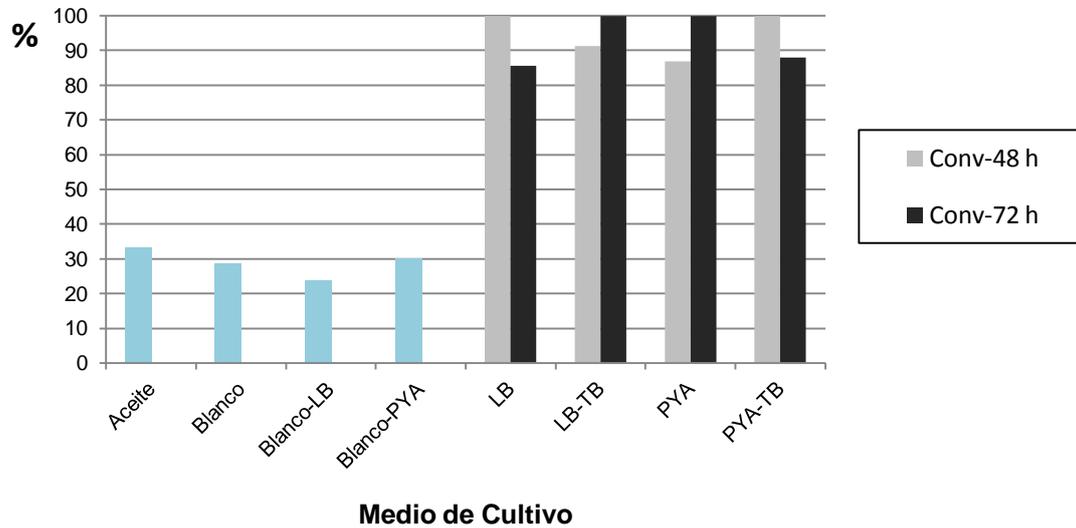
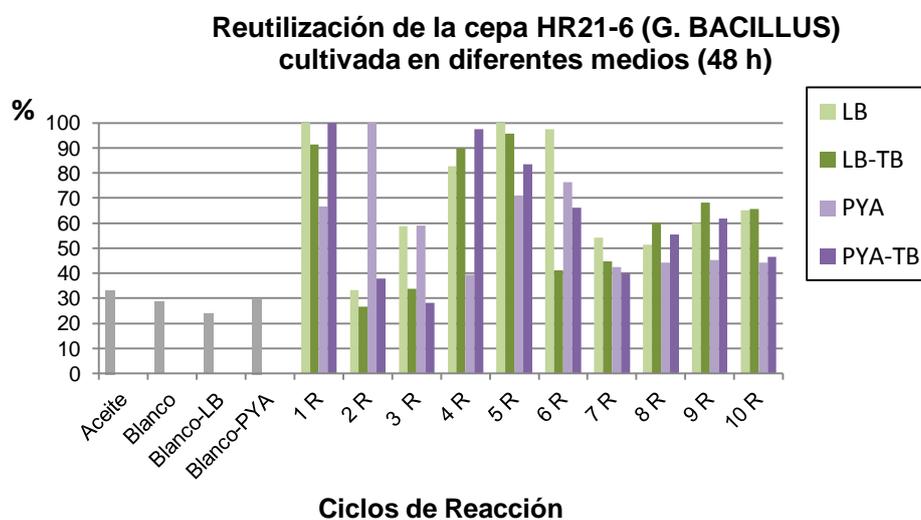


Figura 4.62. Rendimiento del extracto lipásico de la cepa HR21-6 (*G. Bacillus*), producida en diferentes medios de cultivo (LB, PYA) con y sin tributirina, durante 48 h o 72 h, obtenidos por un proceso de purificación simple (diálisis y liofilización) operando en las condiciones de reacción estándar.

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

(a)



(b)

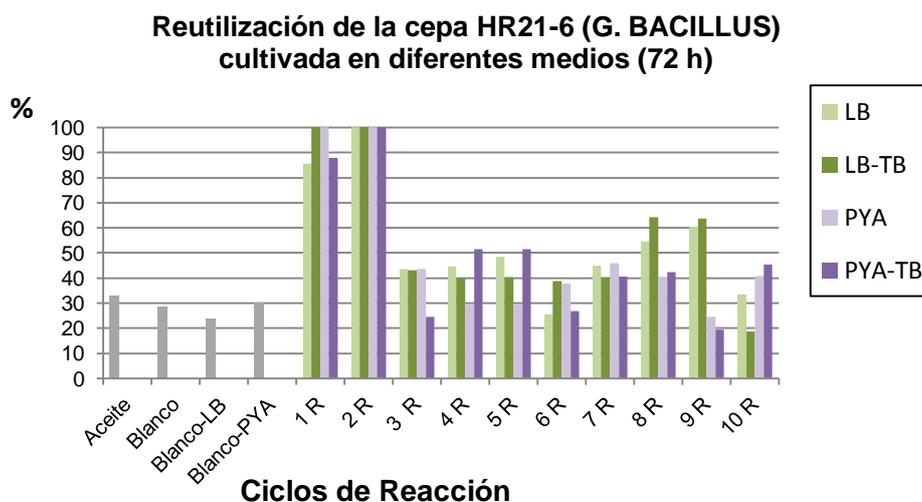
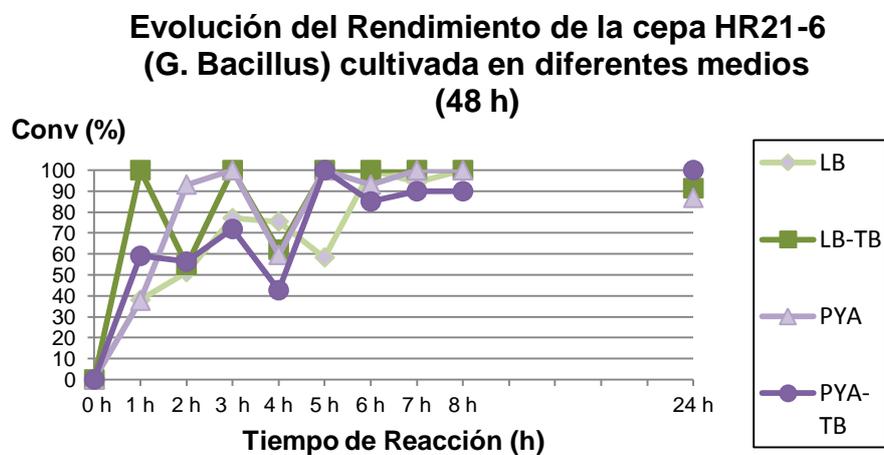


Figura 4.63. Rendimiento a lo largo de los diferentes ciclos de reuso del extracto lipásico de la cepa HR21-6 (*G. Bacillus*), cultivada en diferentes medios de cultivo (LB, PYA) con y sin tributirina, durante 48 h (a) o 72 h (b), obtenidos por un proceso de purificación simple (diálisis y liofilización) y operando en las condiciones de reacción estándar.

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

(a)



(b)

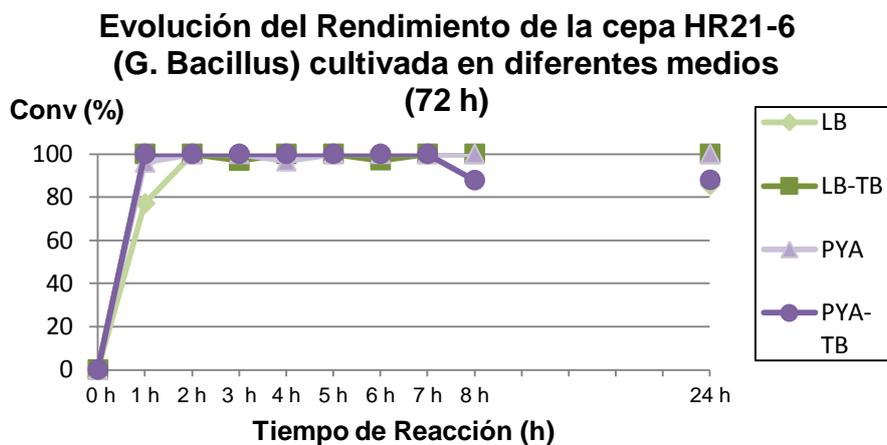


Figura 4.64. Evolución del Rendimiento a lo largo del tiempo de reacción del extracto lipásico de la cepa HR21-6 (G. Bacillus), cultivada en diferentes medios de cultivo (LB, PYA) con y sin tributirina, durante 48 h (a) o 72 h (b), obtenidos por un proceso de purificación simple (diálisis y liofilización) y operando en las condiciones de reacción estándar.

4.4. DISCUSIÓN GENERAL DE TODOS LOS SISTEMAS LIPÁSICOS INVESTIGADOS

Las lipasas son enzimas cuya función fundamental es catalizar *in vivo* la hidrólisis de triacilglicéridos, pero *in vitro* pueden catalizar tanto la hidrólisis como la síntesis de una gran variedad de ésteres, mediante reacciones de esterificación de ácidos libres o de alcoholisis, transesterificación o interesterificación, pudiendo también efectuar la resolución de mezclas racémicas con una selectividad elevada (Palomo et al., 2004). En lo que respecta a la química de los triglicéridos, dichas enzimas, al ser hidrolasas actúan sobre el grupo carboxilo de los enlaces éster presentes en los acilgliceroles para liberar ácidos grasos y glicerol (Jaeger et al., 1999).

En términos genéricos las lipasas incluyen dos grupos principales de enzimas, las carboxilesterasas (EC 3.1.1.1) y las lipasas “auténticas” (EC 3.1.1.3). El único criterio aceptado por el momento para diferenciar a las carboxilesterasas de las lipasas “auténticas” corresponde a la especificidad de sustrato. Las lipasas “auténticas” son específicas para acilgliceroles y otros ésteres con ácidos grasos de cadena larga (≥ 10 átomos de carbono), siendo la trioleína su sustrato de referencia, mientras que las carboxilesterasas actúan específicamente sobre acilgliceroles de cadena corta (< 10 átomos de carbono) y otros ésteres simples, siendo la tributirina su sustrato estándar (Jaeger et al., 1999; Massadeh & Sabra, 2011).

La resolución de la estructura tridimensional de algunas lipasas también está facilitando considerablemente el diseño de estrategias que conducen a una mejora en las propiedades catalíticas de estas enzimas (Jaeger & Eggert, 2002). Si bien se conoce perfectamente el mecanismo catalítico de las reacciones de hidrólisis llevadas a cabo por las lipasas (Henke & Bornscheuer, 2002), se desconoce el mecanismo de catálisis que utilizan para las reacciones de transesterificación o de interesterificación. Sin

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

embargo, como la tríada catalítica de las lipasas consiste de Ser–His–Asp/Glu, se cree que el mecanismo catalítico de transesterificación de las lipasas es similar al de las serina–proteasas. En este aspecto, se han planteado mecanismos para la hidrólisis de enlaces éster siguiendo el mecanismo de las serina–proteasas (Jaeger et al., 1999). Entre otras aplicaciones, estas enzimas lipasas se utilizan en la industria alimentaria, en la industria papelera, así como en el tratamiento de productos residuales o tóxicos, como biosensores, en la producción de biodiésel, etc. (Gunstone, 1999; Pandey, 2003).

En este sentido, las lipasas presentan varias ventajas en comparación con los catalizadores básicos homogéneos convencionales, tales como elevada actividad catalítica para la reacción llevada a cabo bajo condiciones moderadas, capacidad de procesar los aceites vegetales que contienen elevados niveles de ácidos grasos libres y agua, reduciendo la formación de jabones y emulsiones (Yara-Varon et al., 2012). Sin embargo, todavía no se explica claramente por qué es muy difícil obtener el 100% en peso de Conversión, necesitando 48 h o más. Si bien, los rendimientos de alrededor de un 70% en peso se obtienen a tiempos de reacción relativamente breves, en una o dos horas. Obviamente, esto es debido a la naturaleza 1,3-selectiva de las lipasas, que producen alrededor del 30% en peso como MG porque no son capaces de conseguir la alcoholisis completa del TG, dado que no actúan sobre el 2-MG. Con lo que podemos afirmar por tanto, que la catálisis enzimática es especialmente adecuada para la obtención de Ecodiésel, pero no es aplicable para la producción de biodiésel convencional que cumpliera la norma EN 14214, que establece la mezcla de FAME o FAEE como únicos componentes del biocombustible, excluyendo no sólo el glicerol, sino cualquier derivado del mismo.

Sin embargo, la presencia de MG, en la mezcla de productos de reacción, no tiene prácticamente efecto alguno sobre las propiedades de flujo (valores de viscosidad) con respecto al biodiésel convencional (FAME puro). Sí son notables los

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

efectos que provocan pequeñas cantidades de DG o TG, dados sus valores muy superiores de sus pesos moleculares, dobles y triples que los MG o FAME, los cuales curiosamente presentan entre sí valores de viscosidad muy similares. En este sentido, mezclas de biocombustibles obtenidos con Conversión 100% pueden presentar valores de viscosidad del orden de 15 cSt, debido a que su Selectividad no sea muy elevada. De ahí la importancia de considerar la Selectividad como el parámetro más representativo, toda vez que indica la proporción de FAME, FAEE o MG presente en el biocombustible. Una selectividad próxima al 100% presentará valores de viscosidad muy similares a un biodiésel que se ajuste a la norma EN 14214. De hecho, la composición de ácidos grasos (perfil lipídico) del aceite vegetal empleado para la producción del biocombustible, afectará más a su viscosidad que la presencia de un 30% de MG en el mismo.

En efecto, la presencia de una alta proporción de ácidos grasos saturados como sucede en el aceite de palma, que contiene 42.5 % de palmitoleico (C16-n), o el aceite de coco, que contiene 47 % de ácido láurico (C12-n) y 17% mirístico (C14-n) provoca una importante elevación de la viscosidad, con respecto a aceites como el girasol, que contiene 63% de linoleico (C18-2=). Aunque los MG de un determinado ácido graso presenten una viscosidad algo más elevada que su correspondiente FAME o FAEE, el impacto de la composición de ácidos grasos influye mucho más que la presencia de un 30% de MG en lugar de FAME o FAEE.

Por otra parte, el uso como B100, del biodiésel puro en los motores de ID actuales no es del todo aconsejable, sobre todo por su comportamiento en ambientes de climas fríos. Sin embargo, el uso de biodiésel convencional o del Ecodiésel, como aditivo para el diésel fósil (por ejemplo, como B20) se muestra como una opción muy adecuada para su aplicación en los motores diésel existentes. En tal caso, el Ecodiésel

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

enzimático presenta todo tipo de ventajas: económicas, técnicas y medioambientales respecto al biodiésel convencional. Sin embargo, resulta complejo seleccionar un sistema lipásico, entre todos los hasta ahora investigados, como el más adecuado para su aplicación a escala industrial, dado que, además de la eficiencia catalítica y la robustez del sistema (que permite su reutilización en procesos sucesivos) influyen otros factores como el precio o su disponibilidad a escala industrial.

Podemos apreciar en las siguientes Tablas, un resumen con los resultados de los principales sistemas lipásicos estudiados previamente en anteriores investigaciones (**Tabla 4.4**) y en el presente trabajo (**Tabla 4.5**), así podemos evaluar más fácilmente los resultados obtenidos hasta el momento, para determinar ventajas o puntos débiles de cada uno de ellos.

Si comparamos el rendimiento de todos estos sistemas catalíticos propuestos, como se resume en la **Figura 4.65**, podemos estimar como los rendimientos y los valores de factores de reacción son similares entre ellos, y todos con suficiente eficacia para posibilitar su viabilidad, incluso dar paso al escalado a nivel de planta piloto.

Destacar que los tiempos óptimos de reacción de los extractos obtenidos a partir de cultivos de cepas estándar de *C. antarctica* de la CECT, empleando los medios YPD e YPL-TB, son superiores a los que necesitan el resto de biocatalizadores investigados. Este es un aspecto relevante a la hora de considerar su aplicación a escala de industrial.

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Tabla 4.4. Sistemas lipásicos estudiados hasta el momento para la producción biocatalítica de Ecodiésel.

Biocatalyst (Lipase)	Form of use	Crutial Reaction parameters				References
		ANOVA		OVAT		
		Oil/ EtOH	T ^a °C	Biocatalyst weight (g)	Reuses	
PPL [®] (Commercial Pig Pancreatic lipase)	Free	1:2.6	45	0.01	0	(C. Verdugo et al., 2010)
	Physical adsortion	1:10.3	45	0.5/0.01	11	(Caballero et al., 2009)
	Covalent Inmob ¹	1:4	40	0.5/0.01	40	(C. Luna et al., 2013)
	Covalent Inmob ²	1:4	40	0.5/0.01	25	
Lipopan [®] (<i>Thermomyces lanuginosus</i>)	Free	1:3.5	20	0.02	0	(Cristobal Verdugo et al., 2011)
MML (<i>Rhizomucor miehei</i>)	Free	1:6	30	0.015	0	-
Lipozyme RM IM [®] (<i>Rhizomucor miehei</i>)	Comercial immobilized	1:6	40	0.04	12	(Calero et al., 2014)
Biolipase- R [®] (<i>Rhizopus Oryzae</i>)	Free	1:6	20	0.02	0	(C. Luna, C. Verdugo, et al., 2014a)
	Physical adsortion	1:6	30	0.5/0.01	9	(C. Luna, C. Verdugo, et al., 2014b)
	Covalent Inmob ¹	1:6	30	0.5/0.01	-	
	Covalent Inmob ²	1:6	30	0.5/0.01	9	

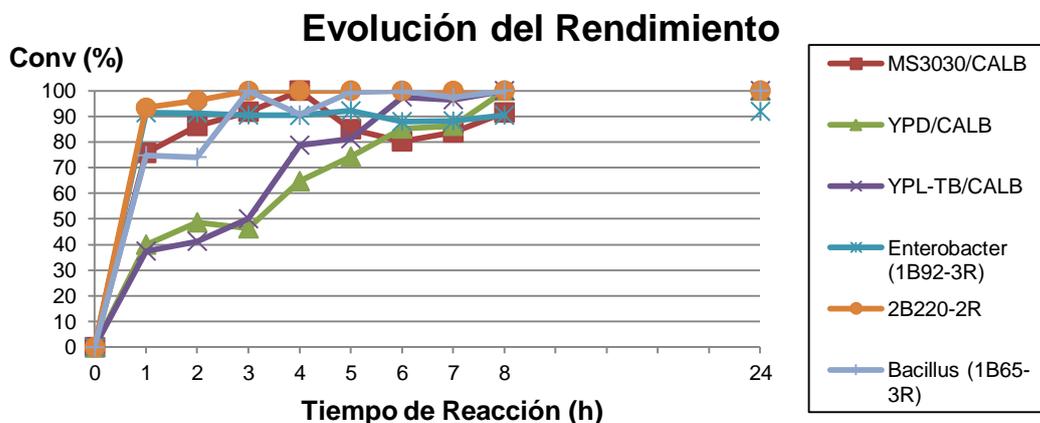
4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Tabla 4.5. Sistemas lipásicos estudiados en el presente trabajo para la producción biocatalítica de Ecodiésel.

	Biocatalyst (Lipase)	Origin	Form	Crutial Reaction parameters				
				ANOVA		OVAT		
				Oil/ EtOH	T ^a (°C)	Biocatalyst weight (g)	Reuses	
COMMERCIAL LIPASES	Lipopan [®]	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Free	1:3.5	20	0.02	0	
	CALB	<i>Candida antarctica</i>	Free	1:6	30	0.02	0	
			Physical adsorption	MS 3030	1:6	30	0.05	10
				PMO			0.1	
	N435 [®]		Comercial immobilized	1:6	30	0.5	16	
Enzymatic extracts	WILD STRAINS	Oil environment	<i>G. Terribacillus</i>	Free	1:6	30	0.5	10
		Animal fat environment	<i>G. Bacillus</i>	Free	1:6	30	0.5	10
	STANDARD STRAIN	CALB (CECT)	<i>Candida antarctica</i>	Free	1:6	30	0.5	10

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

(a)



(b)

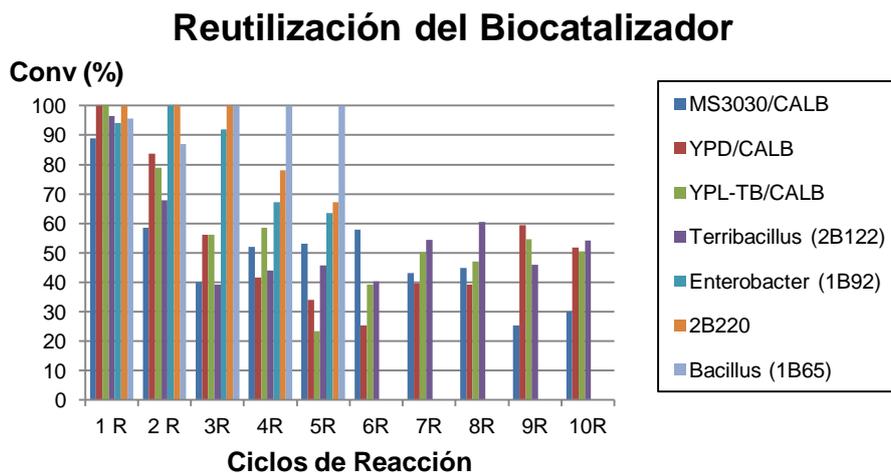


Figura 4.65. Rendimiento de todos los sistemas biocatalíticos investigados en el presente estudio operando en condiciones estándar (a) a lo largo del tiempo de reacción. (b) En sucesivos ciclos de reacción.

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Tenemos por tanto que, a través de una metodología sencilla, una liofilización con diálisis previa, del extracto de un cultivo relativamente fácil de realizar, partiendo de cepas silvestres o cepas convencionales es posible acceder a un material enzimático, capaz de obtener no sólo los requisitos mínimos para llevar a cabo el proceso de alcoholisis enzimática conducente a la producción de Ecodiésel, de una manera sencilla y económica, con resultados equiparables o incluso mejores, que los obtenidos con las lipasas purificadas actualmente disponibles en forma comercial.

Es decir, los resultados obtenidos en este trabajo indican que se pueden conseguir resultados muy similares, empleando extractos lipásicos obtenidos de cultivos de cepas silvestres o estándar, también aplicando como biocatalizadores lipasas comerciales, muy purificadas, pero de un precio comparativamente mucho más elevado, dado que esta purificación supone emplear técnicas como la cromatografía o electroforesis, por lo general aplicadas para obtener las enzimas muy purificadas comerciales que encarecen extraordinariamente los extractos obtenidos, debido al rendimiento alcanzado, no tan elevado como era de esperar. Este grado de purificación es imprescindible, si se quieren emplear en estudios bioquímicos, donde se pretenden obtener resultados asociados a la acción de una enzima específica, sin riesgo de interferencia de otras enzimas presentes en el medio estudiado. Es a este tipo de necesidades bioquímicas a las que responden las enzimas disponibles comercialmente en la actualidad.

Sin embargo, para la aplicación de las enzimas en química fina, no hay ningún problema en que en un extracto enzimático se encuentren presentes un elevado número de enzimas capaces de actuar en procesos diferentes, ya que los sustratos necesarios no existen en el medio de reacción. Así, si nos proponemos biocatalizar una transesterificación, sólo la presencia de lipasas adecuadas, o no, en un extracto enzimático, permitirá que se realice el proceso, independientemente que estas lipasas

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

estén acompañadas o no de otras muchas enzimas (proteasas, amilasas, liasas, oxidasas, reductasas, etc), que no interferirán en el proceso estudiado, dado que no hay presentes sustratos adecuados para poder hacerlo.

En este sentido, a efectos prácticos, 0,5 g de los extractos enzimáticos muy poco purificados (sólo dializados y liofilizados) estudiados en el presente trabajo son capaces de desarrollar una actividad enzimática similar a 0.01-0.04 g de una lipasa comercial, complicada de obtener y muy cara. Esto nos indica que en este material enzimático muy poco purificado, hay suficiente cantidad de lipasas (similares a las presentes en 0.01 g de lipasas purificadas) eficaces para llevar a cabo las reacciones de etanolisis selectivas de 0.005 moles de triglicéridos para su transformación en la mezcla de 2FAEE/1MG que constituye el biocombustible Ecodiésel.

Tenemos por tanto que, una conclusión de los estudios realizados en este trabajo es que para la aplicación de lipasas, u otras enzimas, en procesos de química fina, no es necesario aplicar enzimas sometidas a complejos tratamientos de purificación, que sólo consiguen incrementar extraordinariamente los costos del biocatalizador. Se trata de emplear las cantidades necesarias del extracto enzimático de muy bajo costo, obtenido eso sí, de un cultivo adecuadamente optimizado, bien de cepas silvestres, o simplemente de cepas disponibles comercialmente, portadores de las enzimas adecuadas.

Dado que estos extractos, levemente purificados, contienen un amplio espectro de enzimas, no sería de extrañar que pudieran ser aplicados en varios procesos enzimáticos diferentes, dado que presumiblemente contienen enzimas de muy diverso tipo. Queda así abierta la posibilidad de investigar otros usos de estos mismos extractos, a otros procesos de interés en Química Fina, promovidos por lipasas, o por otras enzimas que también pudieran estar presentes en los mismos.

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En lo que respecta al proceso de obtención de Ecodiésel, empleando los extractos enzimáticos investigados, tras los estudios de rendimiento realizados a lo largo de un periodo de tiempo de reacción y en reacciones sucesivas (**Fig. 4.65**), se puede concluir la capacidad de estos biocatalizadores para ser reutilizados, tras tiempos de reacción similares a los empleados en los procesos químicos convencionales, lo que supone la posibilidad de aplicación de estas lipasas CALB, soportadas o en extractos enzimáticos poco purificados, en forma libre o inmovilizados, en cualquier soporte convencional.

Podemos concluir por tanto de los estudios realizados que estos extractos lipásicos muy poco purificados y de bajo costo, se muestran especialmente eficientes en la obtención de procesos de etanolisis 1,3 selectivas, donde el glicerol se mantiene como MG en la mezcla de biocombustibles, junto con los diferentes FAEEs obtenidos y con el exceso de etanol sin reaccionar. De esta manera, se consigue un nuevo tipo de biodiésel, Ecodiésel, constituido por una mezcla de monoacilgliceroles y FAEEs principalmente (nominalmente 1/2), que se puede utilizar en diferentes mezclas con combustible diésel, sin más separación o proceso de purificación. Este nuevo biocombustible también se puede obtener en tiempos de reacción cortos y en condiciones de reacción más suaves que las exigidas por el proceso químico convencional. Además, no sólo se consigue respecto a la reacción biodiésel convencional, un rendimiento atómico comparativamente mayor (prácticamente 100%) no sólo porque no se genera glicerol como subproducto, sino porque se integran todos los reactivos empleados, incluido el etanol en exceso, lo que permite utilizarlo directamente tras de su producción.

4.5. REFERENCIAS.

- Albuquerque, J. A., Gonzalez, J., Garcia, D., & Cegarra, J. (2004). Agrochemical characterisation of "alperujo", a solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction. *Bioresource Technology*, 91(2), 195-200. doi: 10.1016/s0960-8524(03)00177-9
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). BASIC LOCAL ALIGNMENT SEARCH TOOL. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403-410. doi: 10.1006/jmbi.1990.9999
- An, S.-Y., Asahara, M., Goto, K., Kasai, H., & Yokota, A. (2007). *Terribacillus saccharophilus* gen. nov., sp nov and *Terribacillus halophilus* sp nov., spore-forming bacteria isolated from field soil in Japan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57, 51-55. doi: 10.1099/ij.s.0.64340-0
- Bajaj, A., Lohan, P., Jha, P. N., & Mehrotra, R. (2010). Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: An overview. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 62(1), 9-14. doi: 10.1016/j.molcatb.2009.09.018
- Blanco, R. M., Terreros, P., Fernandez-Perez, M., Otero, C., & Diaz-Gonzalez, G. (2004). Functionalization of mesoporous silica for lipase immobilization - Characterization of the support and the catalysts. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 30(2), 83-93. doi: 10.1016/j.molcatb.2004.03.012
- Bradoo, S., Saxena, R. K., & Gupta, R. (1999). Two acidothermotolerant lipases from new variants of *Bacillus* spp. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 15(1), 97-102.
- Brisou, J., & Prevot, A. R. (1954). ETUDES DE SYSTEMATIQUE BACTERIENNE .10. REVISION DES ESPECES REUNIES DANS LE GENRE ACHROMOBACTER. *Annales De L Institut Pasteur*, 86(6), 722-728.
- Caballero, V., Bautista, F. M., Campelo, J. M., Luna, D., Marinas, J. M., Romero, A. A., . . . Giordano, G. (2009). Sustainable preparation of a novel glycerol-free biofuel by using pig pancreatic lipase: Partial 1,3-regiospecific alcoholysis of sunflower oil. *Process Biochemistry*, 44(3), 334-342. doi: 10.1016/j.procbio.2008.11.015
- Calero, J., Luna, D., Sancho, E. D., Luna, C., Bautista, F. M., Romero, A. A., . . . Verdugo-Escamilla, C. (2015). An overview on glycerol-free processes for the production of renewable liquid biofuels, applicable in diesel engines. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, 42, 1437-1452. doi: 10.1016/j.rser.2014.11.007
- Calero, J., Verdugo, C., Luna, D., Sancho, E. D., Luna, C., Posadillo, A., . . . Romero, A. A. (2014). Selective ethanolysis of sunflower oil with Lipozyme RM IM, an immobilized *Rhizomucor miehei* lipase, to obtain a biodiesel-like biofuel, which avoids glycerol production through the monoglyceride formation *New Biotechnology*. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2014.02.008>
- de la Fuente, C., Clemente, R., & Bernal, M. P. (2008). Changes in metal speciation and pH in olive processing waste and sulphur-treated contaminated soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 70(2), 207-215. doi: 10.1016/j.ecoenv.2007.05.021

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

- Elomari, M., Coroler, L., Hoste, B., Gillis, M., Izard, D., & Leclerc, H. (1996). DNA relatedness among *Pseudomonas* strains isolated from natural mineral waters and proposal of *Pseudomonas veronii* sp nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46(4), 1138-1144.
- Escobar-Nino, A., Luna, C., Luna, D., Marcos, A. T., Canovas, D., & Mellado, E. (2014). Selection and Characterization of Biofuel-Producing Environmental Bacteria Isolated from Vegetable Oil-Rich Wastes. *Plos One*, 9(8). doi: 10.1371/journal.pone.0104063
- Gascon, V. (2014). *Avances en las propiedades de biocatalizadores: Diseño y obtención de materiales mesoporosos ordenados como soportes para la inmovilización no covalente de enzimas*. (Tesis Doctoral), Instituto de Catálisis y Petroleoquímica, CSIC, Madrid. (<http://hdl.handle.net/10261/112074>)
- Gunstone, F. D. (1999). Enzymes as biocatalysts in the modification of natural lipids. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(12), 1535-1549. doi: 10.1002/(sici)1097-0010(199909)79:12<1535::aid-jsfa430>3.0.co;2-7
- Hasan, F., Shah, A. A., & Hameed, A. (2006). Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(2), 235-251. doi: 10.1016/j.enzmictec.2005.10.016
- Henke, E., & Bornscheuer, U. T. (2002). Esterases from *Bacillus subtilis* and *B-stearothermophilus* share high sequence homology but differ substantially in their properties. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60(3), 320-326. doi: 10.1007/s00253-002-1126-1
- Heyrman, J., Logan, N. A., Rodriguez-Diaz, M., Scheldeman, P., Lebbe, L., Swings, J., . . . De Vos, P. (2005). Study of mural painting isolates, leading to the transfer of 'Bacillus maroccanus' and 'Bacillus carotarum' to *Bacillus simplex*, emended description of *Bacillus simplex*, re-examination of the strains previously attributed to 'Bacillus macroides' and description of *Bacillus muralis* sp nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, 119-131. doi: 10.1099/ijs.0.63221-0
- Hoffmann, H., Stindl, S., Stumpf, A., Mehlen, A., Monget, D., Heesemann, E., . . . Roggenkamp, A. (2005). Description of *Enterobacter ludwigii* sp nov., a novel *Enterobacter* species of clinical relevance. *Systematic and Applied Microbiology*, 28(3), 206-212. doi: 10.1016/j.syapm.2004.12.009
- Jaeger, K. E., Dijkstra, B. W., & Reetz, M. T. (1999). Bacterial biocatalysts: Molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annual Review of Microbiology*, 53, 315-+. doi: 10.1146/annurev.micro.53.1.315
- Jaeger, K. E., & Eggert, T. (2002). Lipases for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(4), 390-397. doi: 10.1016/s0958-1669(02)00341-5
- KhyamiHorani, H. (1996). Thermotolerant strain of *Bacillus licheniformis* producing lipase. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 12(4), 399-401. doi: 10.1007/bf00340219
- Kim, H. S., Jeon, J. W., Lee, H. W., Park, Y. I., Seo, W. T., Oh, H. M., . . . Yoon, B. D. (2002). Extracellular production of a glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipid, from *Candida antarctica*. *Biotechnology Letters*, 24(3), 225-229. doi: 10.1023/a:1014100422857
- Kim, Y.-G., Hwang, C. Y., Yoo, K. W., Moon, H. T., Yoon, J.-H., & Cho, B. C. (2007). *Pelagibacillus goriensis* gen. nov., sp nov., a moderately halotolerant bacterium isolated from coastal

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

- water off the east coast of Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57, 1554-1560. doi: 10.1099/ijs.0.64820-0
- Krishnamurthi, S., & Chakrabarti, T. (2008). Proposal for transfer of *Pelagibacillus goriensis* Kim et al. 2007 to the genus *Terribacillus* as *Terribacillus goriensis* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58, 2287-2291. doi: 10.1099/ijs.0.65579-0
- Lesuisse, E., Schanck, K., & Colson, C. (1993). PURIFICATION AND PRELIMINARY CHARACTERIZATION OF THE EXTRACELLULAR LIPASE OF *BACILLUS-SUBTILIS* 168, AN EXTREMELY BASIC PH-TOLERANT ENZYME. *European Journal of Biochemistry*, 216(1), 155-160. doi: 10.1111/j.1432-1033.1993.tb18127.x
- Lopez, N. I., Julia Pettinari, M., Stackebrandt, E., Tribelli, P. M., Potter, M., Steinbuechel, A., & Mendez, B. S. (2009). *Pseudomonas extremaustralis* sp nov., a Poly(3-hydroxybutyrate) Producer Isolated from an Antarctic Environment. *Current Microbiology*, 59(5), 514-519. doi: 10.1007/s00284-009-9469-9
- Luna, C., Sancho, E., Luna, D., Caballero, V., Calero, J., Posadillo, A., . . . Romero, A. A. (2013). Biofuel that Keeps Glycerol as Monoglyceride by 1,3-Selective Ethanolysis with Pig Pancreatic Lipase Covalently Immobilized on AlPO₄ Support. *Energies*, 6(8), 3879-3900. doi: 10.3390/en6083879
- Luna, C., Sancho, E. D., Luna, D., Calero, J., Verdugo, C., Posadillo, A., . . . Romero, A., A. (2014). PRODUCTION OF A BIOFUEL SIMILAR TO CONVENTIONAL BIODIESEL THAT AVOIDS RESIDUAL GLYCEROL BY USING LIPOPAN 50BG, A LOW COST COMMERCIAL *THERMOMYCES LANUGINOSUS* LIPASE. *Récents Progrès en Génie des Procédés*, 106(GPE – 4th International Congress on Green Process Engineering 7-10 April 2014 – Sevilla (Spain)).
- Luna, C., Verdugo, C., Sancho, E. D., Luna, D., Calero, J., Posadillo, A., . . . Romero, A. A. (2014a). A Biofuel Similar to Biodiesel Obtained by Using a Lipase from *Rhizopus oryzae*, Optimized by Response Surface Methodology. *Energies*, 7(5), 3383-3399. doi: 10.3390/en7053383
- Luna, C., Verdugo, C., Sancho, E. D., Luna, D., Calero, J., Posadillo, A., . . . Romero, A. A. (2014b). Biocatalytic Behaviour of Immobilized *Rhizopus oryzae* Lipase in the 1,3-Selective Ethanolysis of Sunflower Oil to Obtain a Biofuel Similar to Biodiesel. *Molecules*, 19(8), 11419-11439. doi: 10.3390/molecules190811419
- Luna, C., Verdugo, C., Sancho, E. D., Luna, D., Calero, J., Posadillo, A., . . . Romero, A. A. (2014c). Production of a biodiesel-like biofuel without glycerol generation, by using Novozym 435, an immobilized *Candida antarctica* lipase. *Bioresources and Bioprocessing*, 1(11). doi: 10.1186/s40643-014-0011-y
- Luna, D., Calero, J., Sancho, E. D., Luna, C., Posadillo, A., Bautista, F. M., . . . Verdugo, C. (2014). Technological challenges for the production of biodiesel in arid lands. *Journal of Arid Environments*, 102, 127-138. doi: 10.1016/j.jaridenv.2013.11.014
- Luna, D., Posadillo, A., Caballero, V., Verdugo, C., Bautista, F. M., Romero, A. A., . . . Calero, J. (2012). New Biofuel Integrating Glycerol into Its Composition Through the Use of Covalent Immobilized Pig Pancreatic Lipase. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(8), 10091-10112. doi: 10.3390/ijms130810091

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

- Massadeh, M. I., & Sabra, F. M. (2011). Production and characterization of lipase from *Bacillus stearothermophilus*. *African Journal of Biotechnology*, *10*(61), 13139-13146.
- Mellado, E., Escobar, A., Canovas, D., & Luna, D. (2013). *Spanish Patent*, Patent No.: U. o. S. University of Cordoba.
- Palomo, J. M., Segura, R. L., Fernandez-Lorente, G., Pernas, M., Rua, M. L., Guisan, J. M., & Fernandez-Lafuente, R. (2004). Purification, immobilization, and stabilization of a lipase from *Bacillus thermocatenulatus* by interfacial adsorption on hydrophobic supports. *Biotechnology Progress*, *20*(2), 630-635. doi: 10.1021/bp0342957
- Pandey, A. (2003). Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, *13*(2-3), 81-84. doi: 10.1016/s1369-703x(02)00121-3
- Ranganathan, S. V., Narasimhan, S. L., & Muthukumar, K. (2008). An overview of enzymatic production of biodiesel. *Bioresource Technology*, *99*(10), 3975-3981. doi: 10.1016/j.biortech.2007.04.060
- Ribeiro, B. D., de Castro, A. M., Coelho, M. A. Z., & Freire, D. M. G. (2011). Production and use of lipases in bioenergy: a review from the feedstocks to biodiesel production. *Enzyme research*, *2011*, 615803-615803. doi: 10.4061/2011/615803
- Rivera, I., Villanueva, G., & Sandoval, G. (2009). Biodiesel production from animal grease wastes by enzymatic catalysis. *Grasas Y Aceites*, *60*(5), 468-474. doi: 10.3989/gya.021409
- Robles-Medina, A., Gonzalez-Moreno, P. A., Esteban-Cerdan, L., & Molina-Grima, E. (2009). Biocatalysis: Towards ever greener biodiesel production. *Biotechnology Advances*, *27*(4), 398-408. doi: 10.1016/j.biotechadv.2008.10.008
- Salis, A., Svensson, I., Monduzzi, M., Solinas, V., & Adlercreutz, P. (2003). The atypical lipase B from *Candida antarctica* is better adapted for organic media than the typical lipase from *Thermomyces lanuginosa*. *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*, *1646*(1-2), 145-151. doi: 10.1016/s1570-9639(02)00556-3
- Sanchez, L. (2012). *Desarrollo de sistemas biológicos para la obtención de energías renovables (biodiesel). Lipasas microbianas*. (Trabajo Fin de Master), Universidad de Sevilla (US), Sevilla.
- Schallmeyer, M., Singh, A., & Ward, O. P. (2004). Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Canadian Journal of Microbiology*, *50*(1), 1-17. doi: 10.1139/w03-076
- Teng, Y., & Xu, Y. (2007). A modified para-nitrophenyl palmitate assay for lipase synthetic activity determination in organic solvent. *Analytical Biochemistry*, *363*(2), 297-299. doi: 10.1016/j.ab.2007.01.026
- Verdugo, C., Luna, D., Posadillo, A., Sancho, E. D., Rodriguez, S., Bautista, F., . . . Romero, A. A. (2011). Production of a new second generation biodiesel with a low cost lipase derived from *Thermomyces lanuginosus*: Optimization by response surface methodology. *Catalysis Today*, *167*(1), 107-112. doi: 10.1016/j.cattod.2010.12.028
- Verdugo, C., Luque, R., Luna, D., Hidalgo, J. M., Posadillo, A., Sancho, E. D., . . . Romero, A. A. (2010). A comprehensive study of reaction parameters in the enzymatic production of novel biofuels integrating glycerol into their composition. *Bioresource Technology*, *101*(17), 6657-6662. doi: 10.1016/j.biortech.2010.03.089

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Yara-Varon, E., Joli, J. E., Torres, M., Sala, N., Villorbina, G., Mendez, J. J., & Canela-Garayoa, R. (2012). Solvent-free biocatalytic interesterification of acrylate derivatives. *Catalysis Today*, 196(1), 86-90. doi: 10.1016/j.cattod.2012.02.055



Ramón Lapayese del Río (1956)

5. CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

Con la presente investigación se pretende posibilitar la producción eficiente mediante catálisis enzimática de un biocombustible, el Ecodiésel, capaz de sustituir, total o parcialmente, al diésel fósil en los motores actuales, sin realizar modificación alguna en los mismos, evitando los inconvenientes medioambientales que lleva asociada la producción del biodiésel convencional, al tratar de satisfacer las exigencias de la norma EN 14214.

En este sentido, en base a la metodología enzimática patentada por la universidad de Córdoba, que evita la producción del glicerol, en el proceso de obtención del biocombustible, manteniéndolo en forma de monoglicérido, se ha realizado el trabajo experimental de la presente Tesis Doctoral. El objetivo de estas investigaciones se ha dirigido a implementar la viabilidad técnica y económica de este proceso, mediante la aplicación de diversos biocatalizadores constituidos por lipasas comerciales, tanto en forma libre como soportada y de diversos extractos enzimáticos lipásicos, obtenidos a partir de cultivos microbianos líquidos, tanto de cepas silvestres como una estándar de CALB. Los principales resultados experimentales y las conclusiones obtenidas al respecto, como consecuencia de las investigaciones realizadas, se detallan a continuación:

- Se han conseguido optimizar Las condiciones de reacción de etanolisis de aceite de girasol para hacer posible la producción de un biocombustible que no genera glicerol, el Ecodiésel, mediante el uso de los diferentes biocatalizadores enzimáticos investigados, que al actuar de forma 1,3 selectiva integra el glicerol como monoglicérido.
- Se han evaluado, con resultados altamente adecuados, desde el punto de vista técnico, los biocatalizadores lipásicos: Lipopan 50 BG; CALB N435; CALB comercial inmovilizada en forma no covalente en soportes inorgánicos, en materiales Mesoporosos Organosilíceos Ordenados (PMO) y sobre material silíceo amorfo MS-

5. CONCLUSIONES

3030 funcionalizado con grupos octilo fijados al soporte mediante reactivos organosilanos; extractos enzimáticos obtenidos a partir de cultivos líquidos, tanto de una cepa estándar CALB de la C.E.C.T. (Colección Española de Cultivos Tipo) como de cepas silvestres recolectadas en ambientes lipófilos (ricos en aceites vegetales o grasas animales).

- Se ha demostrado la viabilidad de todas las lipasas evaluadas, comprobándose en todos los casos que la presencia de una mínima cantidad de disolución acuosa 12N de NaOH (0.2 % respecto al aceite) es fundamental para conseguir que se lleve a cabo el proceso de transesterificación enzimática 1,3 selectiva. Es decir, la acción biocatalítica se debe a la importante activación que experimentan las diferentes lipasas investigadas y por la acción de mínimas cantidades de la disolución acuosa de NaOH muy concentrada.
- Se ha puesto a punto un procedimiento cromatográfico que permite identificar y cuantificar de forma eficiente los diferentes componentes de la mezcla de reacción: FAMES o FAEEs, y los correspondientes monoglicéridos, que constituyen los biocombustibles propuestos, a la vez que se puede confirmar la ausencia de glicerol en los productos de la reacción obtenidos, en las condiciones de operación investigadas.
- En todos los casos ensayados, de todos los biocatalizadores propuestos, se obtienen rendimientos suficientemente eficaces en reacciones sucesivas y a lo largo del tiempo de reacción, que demuestran su potencial biotecnológico y su presumible viabilidad técnica a nivel industrial.

5. CONCLUSIONES

- A la luz de los resultados obtenidos se pueden considerar para cada biocatalizador, una serie de puntos fuertes y debilidades:
 - Lipopan 50 BG (Novozime®), lipasa comercial de bajo costo extraída de *Thermomyces lanuginosus* e insertada en *Aspergillus oryzae*. Los estudios de optimización OVAT, muestran que las condiciones óptimas para la realización de las reacciones de etanolisis 1,3-selectivas, requieren sólo una mínima cantidad de disolución acuosa de sosa y de lipasa, (0.01 ml de NaOH 10 N y 0.01 g, respectivamente, para los volúmenes de reactivos optimizados: 6 ml aceite de girasol comercial, 1.75 ml de Etanol absoluto), operando prácticamente a temperatura ambiente (30 °C). El único problema asociado con esta lipasa comercial es su uso en forma homogénea y por tanto la imposibilidad para ser reutilizada.
 - Novozym 435 (CALB), un preparado comercial de la levadura *Candida antarctica*, recombinante, expresada en el hongo *Aspergillus niger* e inmovilizada sobre una resina acrílica macroporosa. Los estudios de optimización realizados mediante una metodología ANOVA, que ha proporcionado modelos estadísticos para predecir con suficiente exactitud la Conversión, Selectividad y la Viscosidad cinemática, en función de las variables de entrada Temperatura, mínimas cantidades de disolución acuosa NaOH 10N y la ratio aceite/alcohol. El principal inconveniente de este biocatalizador comercial es su baja estabilidad cuando se emplea en un medio tan liposoluble como los aceites o los productos de su transesterificación, donde se emulsionan convirtiéndose en un material gelatinoso muy incómodo para trabajar en las reutilizaciones sucesivas, que hace necesario la centrifugación de los productos de reacción para conseguir la recuperación del catalizador. Esta etapa de centrifugación

5. CONCLUSIONES

adicional puede constituir un inconveniente importante para su aplicación en un proceso a escala industrial.

- CALB comercial, inmovilizada en forma no covalente en soportes inorgánicos, en materiales Mesoporosos Organosilíceos Ordenados (PMO) y sobre material silíceo amorfo MS-3030 funcionalizado con grupos octilo fijados con reactivos organosilanos. Se comprueba como el soporte MS-3030 presenta mejores rendimientos, aunque sucede el mismo fenómeno que con la N435, el sistema biocatalítico se emulsiona tras la primera reacción de etanolisis, por lo que se hace necesario centrifugar los productos de reacción para recuperar el biocatalizador y posibilitar sus sucesivas reutilizaciones.
- Extracto enzimático obtenido a partir del cultivo líquido de una cepa estándar de CALB procedente de la CECT (Colección Española de Cultivos Tipo). Tras la optimización del medio y condiciones de cultivo de la cepa para conseguir extractos eficaces, se demuestra la viabilidad del uso de dichos extractos enzimáticos no purificados, obtenidos de forma sencilla, a partir de cultivos microbianos líquidos (simplemente mediante liofilización con diálisis previa) para su aplicación en el proceso de etanolisis selectiva conducente a la obtención de biocombustibles, sin generar glicerol como subproducto. La utilización de estos extractos enzimáticos puede abaratar de forma muy considerable la obtención de Ecodiésel, mediante este proceso.
- Los extractos obtenidos a partir de cepas "silvestres" recolectadas en ambientes lipófilos, ricos en aceites vegetales o grasas animales, han resultado igualmente eficaces que los obtenidos empleando la cepa estándar de CALB, cuando se aplican las mejores cepas obtenidas tras la

5. CONCLUSIONES

realización de un amplio screening de estas cepas “silvestres”. Igualmente, aplicando sus extractos poco purificados, obtenidos por liofilización con diálisis previa.

- Se ha efectuado la caracterización de algunas de las cepas silvestres (*Terribacillus*, *Bacillus*, etc.) con rendimiento elevado en la reacción de etanolisis para la producción de biocombustibles, lo que ha permitido solicitar una patente conjunta entre las Universidades de Córdoba y Sevilla, P201300039, con fecha de prioridad 11/01/2013, titulada “Cepa microbiana *Terribacillus* SP.AE2B 122 con capacidad para llevar a cabo reacciones de transesterificación y usos de las mismas”. Los estudios del rendimiento en sucesivas reacciones y a lo largo del tiempo de reacción demuestran su potencial biotecnológico.
- Los resultados al emplear extractos enzimáticos, obtenidos a partir de cultivos líquidos de cepas de diferentes microorganismos, a través de una metodología sencilla, una liofilización con diálisis previa, ponen de manifiesto que es posible acceder a un material enzimático capaz de llevar a cabo el proceso de alcoholisis enzimática conducente a la síntesis de Ecodiésel, de una manera sencilla y económica, con resultados equiparables o incluso mejores, que los conseguidos empleando las lipasas comerciales muy purificadas, las únicas actualmente disponibles en forma comercial, pero de un precio muy elevado, lo que necesariamente influirá en la viabilidad económica del proceso de producción de Ecodiésel.
- Un elevado grado de pureza en un determinado preparado enzimático es imprescindible, si se quiere emplear en estudios bioquímicos, asociados a la acción de una enzima específica, sin riesgo de interferencia de otras enzimas presentes en el medio estudiado. Sin embargo, para la aplicación de las enzimas en procesos de

5. CONCLUSIONES

química fina es más conveniente el empleo de extractos enzimáticos muy poco purificados (y por tanto mucho más económicos) en los que, aunque se encuentren presentes un elevado número de otras enzimas capaces de actuar en procesos diferentes, no interferirán, ya que sólo podrán actuar las enzimas que encuentren los sustratos necesarios para participar en las reacciones enzimáticas. La presencia de otras enzimas no interferirán al no encontrar moléculas adecuadas para ello.

- La obtención de extractos enzimáticos poco purificados y de muy bajo costo pudieran constituir un nuevo paradigma en lo que se refiere a la aplicación de las enzimas en Química Fina, ya que al contener un amplio espectro de enzimas, cabe la posibilidad de su aplicación en varios procesos enzimáticos diferentes. Queda así abierta la posibilidad de investigar otros usos de estos mismos extractos, en otros procesos de interés en Química Fina, promovidos por lipasas, o por otras enzimas que también pudieran estar presentes en los mismos.
- En lo que respecta al proceso de obtención de Ecodiésel empleando los extractos enzimáticos muy poco purificados y de bajo costo, se muestran especialmente eficientes en la obtención de procesos de etanolisis 1,3 selectivas, donde el glicerol se mantiene como MG en la mezcla de biocombustibles, junto con los diferentes FAEEs obtenidos, y con el exceso de etanol sin reaccionar. De esta manera, se consigue un nuevo tipo de biodiésel, el Ecodiésel, constituido por una mezcla de monoacilgliceroles y FAEEs principalmente (nominalmente 1/2), que se puede utilizar en diferentes mezclas con combustible diésel convencional, sin más separación o proceso de purificación. Este nuevo biocombustible también se puede obtener en tiempos de reacción cortos y en condiciones de reacción más suaves que las exigidas por el proceso químico convencional. Además, no sólo se consigue, respecto a la reacción biodiésel convencional, un rendimiento atómico comparativamente mayor (prácticamente 100%), no sólo porque no se genera

5. CONCLUSIONES

glicerol como subproducto, sino porque se integran todos los reactivos empleados, incluido el etanol en exceso, lo que permite utilizarlo directamente tras de su producción.

5. CONCLUSIONS

5. CONCLUSIONS

With the present research work is pretended to enable the efficient production by enzymatic catalysis of a biofuel, the Ecodiesel, capable to replace, totally or partially, the fossil diesel in current engines, without making any modification in them. In this way, avoiding environmental drawbacks that are associated to the conventional biodiesel production, since they are satisfied the requirements of EN 14214.

In this respect, based on enzymatic methodology patented by the University of Cordoba, which avoids the glycerol production in the process of obtaining biofuel, keeping it as monoglyceride. So, it was performed the experimental work of this thesis. The aim of these researches has been directed to implement the technical and economic feasibility of this process, by applying various biocatalysts. These were constituted by commercial lipases, both free form as supported, and various enzymatic extracts obtained from microbial broths, either from wild strains or from a standard CALB strain. The main experimental results and conclusions achieved as results of this research work are detailed below:

- It has been achieved to optimize reaction conditions of the ethanolysis of sunflower oil to make possible the production of a biofuel that does not generate glycerol as byproduct (Ecodiesel). Through using different tested heterogeneous enzymatic biocatalysts, since they are 1,3 selective, integrate glycerol as monoglyceride.
- It has been evaluated, with highly appropriate results, from the technical point of view the lipase biocatalysts: Lipopan 50 BG; N435 CALB; commercial CALB non covalently immobilized on inorganic supports, like over periodic mesoporous organosilica (PMO) and amorphous siliceous material 3030-MS functionalized by octyl groups attached to the support by organosilanes; enzymatic extracts obtained from microbial broths, both of the standard CALB strain of the CECT (Type

5. CONCLUSIONS

microbial Cultures Spanish Collection) as wild strains collected in lipophilic environments (rich in vegetable oils or animal fats).

- It has been demonstrated the viability of all the tested lipases, proving that in all cases the presence of a minimum amount of a NaOH 12N aqueous solution (0.2% of the oil) is essential to achieve the perform of the 1,3 selective enzymatic transesterification process. That is, the biocatalytic action is due to the significant activation experimented by the different tested lipases and by the action of minimum quantities of highly concentrated NaOH aqueous solution.
- It has been developed a chromatography method that allows identifying efficiently the different components of the reaction mixture: FAMES or FAEEs, and the corresponding monoglycerides, that constitutes the proposed biofuels, at the same time it can be confirmed the absence of glycerol in the obtained reaction products, in the investigated operating conditions.
- In all tested cases, of all proposed biocatalysts, enough effective yields are obtained in successive reactions and along the reaction time, demonstrating their biotechnological potential and technical presumed feasibility at an industrial level.
- From obtained results, it can be considered for each biocatalyst, a set of strengths and weaknesses:
 - Lipopan 50 BG (Novozime®), a low cost commercial lipase extracted from *Thermomyces lanuginosus* and inserted into *Aspergillus oryzae*. OVAT optimization studies show that optimum conditions to conduct 1, 3-selective ethanolysis reactions require only a minimal amount of aqueous sodium hydroxide solution and of lipase (0.01 ml of 10N NaOH and 0.01 g, respectively, for the optimized reagent volumes: 6 ml of commercial sunflower oil, 1.75 ml of absolute ethanol), operating at practically room

5. CONCLUSIONS

temperature (30 °C). The only associated problem with commercial lipase is its use in homogeneous form and therefore it is unable to be reused.

- Novozym 435 (CALB), a commercial preparation of the recombinant *Candida antarctica* yeast expressed in the *Aspergillus niger* fungus and immobilized onto a macroporous acrylic resin. Performed optimization studies by ANOVA methodology, has provided statistical models to predict with sufficient accuracy the conversion, selectivity and Kinematic viscosity, depending on the input variables temperature, minimal amounts of aqueous 10N NaOH solution and the oil/alcohol ratio. The main disadvantage of this commercial biocatalyst is its low stability when it is used in a liposoluble medium such as oils or transesterification products, where it is emulsified becoming in a gelatinous material very uncomfortable to work for the subsequent reuse. So that, it is required the centrifugation of the reaction products for the catalyst recovery. This additional centrifugation step could be an important inconvenient to its application in a process on an industrial scale.
- Commercial CALB non covalently immobilized on inorganic supports, like over periodic mesoporous organosilica (PMO) and amorphous siliceous material 3030-MS functionalized by octyl groups attached to the support by organosilanes reactives. It is checked as the 3030-MS support has better yields, although it happens the same phenomenon as with the N435, the biocatalytic system is emulsified after the first ethanolysis reaction, so it is necessary to centrifuge the reaction products to recover the biocatalyst and to make enable its subsequent reuse.
- Standard CALB strain of the CECT (Type microbial Cultures Spanish Collection). After medium and culture conditions optimization of the strain

5. CONCLUSIONS

to achieve effective extracts, the feasibility of using these unpurified easily obtained enzymatic extracts (simply by lyophilization with previous dialysis), from microbial broths is demonstrated. So that, its application in the selective ethanolysis process conducting to the biofuels obtention, without generating glycerol as byproduct. The use of these enzyme extracts can make considerably cheaper the obtaining of Ecodiesel through this process.

- The obtained extracts from "wild" strains, collected in lipophilic environments rich in vegetable oils or animal fats, have proven to be equally effective as those obtained using a CALB standard strain. Then, the best strains selected after performing an extensive screening of these "wild" strains. Similarly, applying their little purified extracts obtained by lyophilization with previous dialysis.
- It has been made the characterization of some of the wild strains (*Terribacillus*, *Bacillus*, etc.) with high ethanolysis reaction yield of biofuels production, which allowed to get a patent between the universities of Cordoba and Seville, P201300039 with priority date 11/01/2013, entitled "Microbial Strain *Terribacillus* SP.AE2B 122 capable of carrying out transesterification reactions and uses thereof." Performance studies in successive reactions and along the reaction time demonstrate their biotechnological potential.
- Regarding the obtained results using enzymatic extracts from different microbial broths, through a simple method, lyophilization with prior dialysis. They show that is possible to access to an enzymatic material capable of carrying out the enzymatic alcoholysis process to produce Ecodiesel, in a simple and economical way, with comparable or even better

5. CONCLUSIONS

results than those achieved using highly purified commercial lipases. Which are the only currently available commercially biocatalyst, but in a very high price. This fact necessarily will influence the economic viability of the production process Ecodiesel.

- A high degree of purity at a given enzyme preparation is essential, if it is wanted to employ it in biochemical studies, associated to the action of a specific enzyme, without risk of interference from other present enzymes in the studied reaction medium. However, for the application of enzymes in fine chemical processes it is more advantageous to use little purified enzyme extracts (and hence more economical). In which, although a large number of other capable of acting enzymes are present in different processes, they will not interfere, because only the enzymes that find the substrates needed to participate in enzymatic reactions may act. The presences of other enzymes do not interfere, as they do not find suitable molecules for this.
- Regarding the process of Ecodiesel obtention employing the little purified and inexpensive extracts. They show that are particularly efficient in obtaining the 1.3 selective ethanolysis processes where glycerol is kept as MG in the mixture of biofuel together with different obtained FAEEs and the excess of unreacted ethanol. Thus, it is achieved a new type of biodiesel, Ecodiesel, constituted by a mixture of monoacylglycerols and FAEEs (nominally 1/2), which can be used in different mixtures with diesel fuel, without further separation or purification process. This new biofuel can also be obtained in short reaction times and milder reaction conditions than those required by conventional chemical reaction process. Furthermore, it is not only achieved, respect to the conventional biodiesel

5. CONCLUSIONS

reaction, a comparatively higher atomic yield (almost 100%). That is not only because no glycerol is produced as byproduct, also that all used reagents are integrated, including excess ethanol, which It allows to be used directly after its production.



Amadeo Gabino (1956). MS Molezun (1956)

6. ANEXOS

6.1. MEMORIA DEL TRABAJO REALIZADO EN LA ESTANCIA PARA LA OBTENCIÓN DE LA MENCIÓN INTERNACIONAL EN EL TÍTULO DE DOCTOR.

CENTRO RECEPTOR:

- Institute of Chemical Technology (University of Leipzig)
- **SUPERVISOR:** Professor Gläser.

SYNTHESIS OF γ -VALEROLACTONE FROM BIOMASS DERIVED COMPOUNDS BY AQUEOUS PHASE PROCESSING USING SUPPORTED MONO- AND BIMETALLIC CATALYSTS

1. INTRODUCTION

For modern biorefineries, a major challenge is to develop cost-efficient processing methods for the transformation of highly functionalized carbohydrates into value-added chemicals. Towards that goal, several investigations have been devoted to the conversion of biomass-derived model compounds into biofuels by catalytic aqueous-phase processing (APP). APP involves catalytic transformations as aqueous-phase reforming, dehydration, hydrogenation, hydrogenolysis, and condensation reactions, for conversion of carbohydrates to hydrogen and alkanes in liquid aqueous phase at mild conditions (~ 500 K, 5 MPa) [1].

γ -Valerolactone (GVL), useful as renewable solvent or fuel additive, can be subsequently converted into a broad slate of valuable fine chemicals [2]. It can be obtained by heterogeneously catalyzed hydrogenation of levulinic acid (LA), which is accessible from lignocellulosic biomass through a simple and robust hydrolysis process [3].

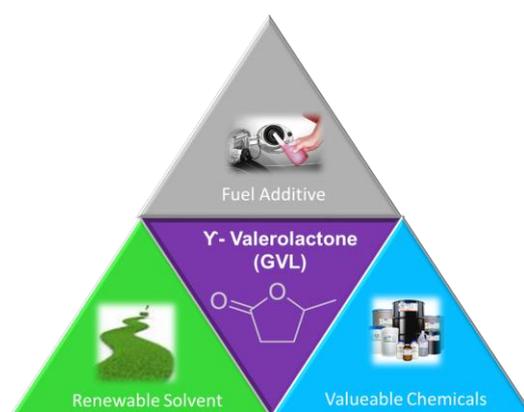


Fig.1. Main industrial applications for the GVL, as a platform molecule.

Furthermore, a stable support containing acidic sites is of high importance in APP of lignocellulosic biomass-derived feedstocks. Bimetallic catalysts often show electronic and chemical properties that are distinct from those of their monometallic counterparts. Consequently, they could offer the opportunity to obtain catalysts with enhanced activity, selectivity and stability.

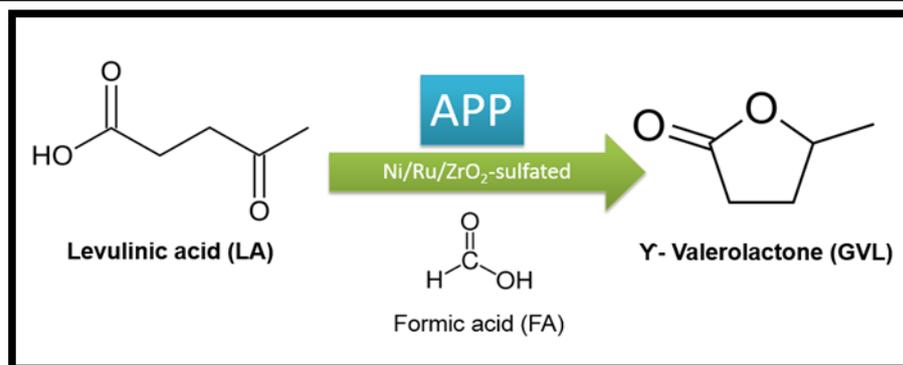


Fig.2. Reaction scheme of the APP reaction for GVL production from LA.

2. OBJECTIVES

Thus, the present work aimed to investigate the potential of mono- and bimetallic Ru, and Ni catalysts supported on sulfated ZrO₂ (ZrO₂-S) towards the production of GVL from biomass derived LA by APP.

3. EXPERIMENTAL SECTION.

3.1. Catalyst preparation.

Supported Ni-Ru bimetallic catalysts with desired molar ratio were prepared by incipient wetness impregnation (IWI) on ZrO₂. The amount of metallic aqueous solution needed to achieve the desired loading of Ru was added to the support which was dried afterwards at 373 K for 12 h. The resulted material was then impregnated with nickel (II) nitrate aqueous solution and dried at 373 K for 12 h. The impregnated catalyst was calcined in air at 373 K for 1 h and then at 623 K for 3 h (temperature ramp of 4 K min⁻¹).

Before the catalytic experiments, the catalyst was reduced by flowing a mixture of 2 cm³ min⁻¹ H₂ and 8 cm³ min⁻¹ N₂ at 393 K for 1 h (6 K min⁻¹ temperature gradient), and then at 623 K for 4 h (5 K min⁻¹ temperature gradient).

3.2 Characterization Methods

The reference, calcined and spent catalysts were characterized comprehensively by a variety of techniques.

ICP-OES elemental analysis. The metal content of the calcined catalysts was determined by

optical emission spectroscopy with inductively coupled plasma (ICP-OES). The procedure includes dissolution of the sample in HF/HNO₃/HCl/H₂SO₄/H₃PO₄/H₂O solution for ZrO₂-based materials and HF/HNO₃/HCl solution for γ -Al₂O₃-based materials followed by analysis using a Vario EL-Heraeus microanalyzer. The error of the instrument is ± 0.01 .

Temperature programmed reduction analysis. The redox properties of the supported metal oxides resulted after calcination were determined by temperature programmed reduction (TPR).

The samples were pretreated firstly in flow of Ar for 1 h at 573 K and then were cooled down to 313 K. Afterwards, the samples were reduced with a mixture of Ar and H₂ gas at 30 ml min⁻¹ flow rate at a heating rate of 10 K min⁻¹ until the temperature reached 1073 K. The maximum temperature was kept constant for 1 h then the samples were cooled down to 308 K. The detector used was a TCD with a gain value of 50.

N₂ sorption. A Micromeritics ASAP2000-Physisorption Analyzer was utilized to record the N₂ sorption isotherms for calcined and spent catalysts. All the samples were degassed at 523 K under the vacuum pressure of 3·10⁻⁸ Pa for 6 h before measurements and the isotherms were taken at 77.35 K. The specific surface area (ABET /m² g⁻¹) of the sample was calculated by BET (Brunauer–Emmett–Teller) model. The specific pore volume (V_p /cm³ g⁻¹) and the pore width distribution were deduced from the BJH (Barrett, Joyner, Halenda) desorption method.

Temperature programmed desorption (TPD) analysis. This method is applied to check the loss of acid sites of the ZrO₂ sulfated support (Z-S) with the temperature. All investigations were carried out in a flow system with helium as carrier gas (3 liters per hour). A heat conductivity detector and a TCD were used for the evolved gas detection. For each experiment 50 mg of sample were used. The sample was heated (10 K/min) in a stream of helium (3 liters per hour) up to 700 K or 923 K and kept at this temperature for 2 hours, then cooled down to 323 K. At this temperature different amounts of NH₃ were adsorbed.

3.3 APP of Biomass Derivatives.

3.3.1. Biomass Model Mixture.

The composition of the model mixture used in the catalytic experiments was given by the Deutsches Biomasseforschungszentrum (DBFZ), Leipzig. It was selected based on the analysis results for the pretreated and hydrolyzed wet waste biomass i.e., grass. The biomass model mixture solution was defined as an aqueous solution with 5wt.-% organic component which consists of formic acid (FA) (40 wt.-%), vanillin (V) (10 wt.-%) and levulinic acid (LA) (6 wt.-%).

3.3.2. Experimental setup.

APP of the biomass derivatives solutions were carried out in a 300 cm³ batch reactor (4566 Mini reactor, Parr Instrument Company) equipped with head stirrer and fixed thermocouple. The pressure, temperature and the stirring speed were controlled by a digital controller (4848 Reactor Controller, Parr Instrument Company). The H₂ and N₂ were supplied to the system using high pressure valves (Swaglock). The reactor that has been used in the catalytic experiments is shown in Figure 3.



Figure 3. Reactor system used in APP of biomass derivatives solutions.

3.3.3 Catalytic Experiment

In a typical experiment 125 cm³ of the fresh prepared aqueous solution of biomass derivatives and 300 mg of catalyst were introduced to the reactor. The stirring rate was set at 700 min⁻¹. The reactor was purged by flowing 3.0 MPa of N₂ in order to remove the air from the system. Afterwards, the reactor was sealed and heated until the reaction temperature (423 K) was reached. Then, 5 MPa of H₂ was introduced to the reactor. After 6 h under H₂ pressure, the experiment was stopped.

Samples were withdrawn from the reactor every hour and centrifuged to separate the solid particles from the solution. Then, the liquid sample were analyzed by gas chromatography coupled to a flame ionization detector (GC-FID). The analysis was performed by injection of the liquid samples in GC instrument (Hewlett Packard HP6890 Series) equipped with Stabilwax-MS column (30 m × 0.25 m × 0.25 μm). The temperature program was heating from 433 K with a ramp of 20 K min⁻¹ to 493 K which was maintained for 12 min.

4. RESULTS.

4.1 Catalysts Characterization

4.1.1. Temperature programmed desorption (TPD) analysis.

This method is applied to check the loss of acid sites of the ZrO_2 sulfated support (Z-S) with the temperature during calcination and reduction processes, which could affect to catalyst activity. In this respect, this checked acid site loss could explain the less reaction yield obtained during the APP reaction.

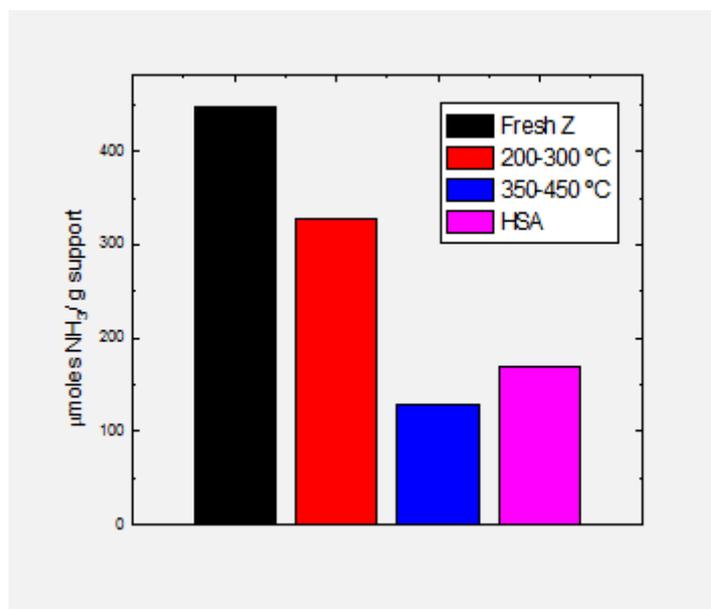


Figure 4. Loss of acid sites shown by NH_3 -TPD (Temperature Program Desorption) of the Sulfated- ZrO_2 support: Fresh, after calcination and reduction at different temperatures and compared to a conventional High surface Area ZnO_2 Support (HSA-Z)

4.1.2. Metal Content

The metal content of prepared bimetallic catalysts (calcined) catalysts was determined by ICP-OES. The determined metal loadings are presented in the Table 1.

The elemental analysis of the catalysts, showed how the metal loading was a bit lower than the expected Metal loading respectively. The lower content of metals that was detected could be caused by systematic errors as loss of precursors during impregnation, drying or calcination stages.

Another source of errors could be the dilution of samples before elemental analysis.

Table 1. Metal content of the fresh vs. spent catalysts, determined by ICP-OES.

CATALYSTS	Metal content / wt.-%			
	FRESH		SPENT	
	Ni	Ru	Ni	Ru
Ni/ZrO ₂ (2%) (350°-550°)	1.91	-	1.32	-
Ni/ZrO ₂ (2%) (200°-380°)	1.90	-	1.27	-
Ni/ZrO ₂ (5%) (350°-550°)	4.50	-	3.09	-
Ru/ZrO ₂ (0.5 %) (350°-550°)	-	-	-	0.41
Ni/Ru/ZrO ₂ (10/2 %) (350°-550°)	-	-	0.5	0.31

4.1.3. Redox Properties

The identified reduction temperatures are shown in Figure 4, varying between the methal and the load of it.

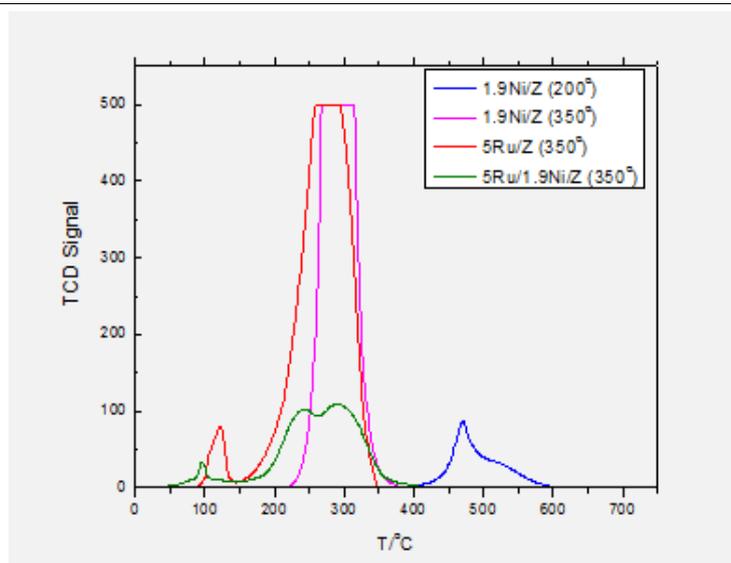


Figure 5. Temperature programmed reduction (TPR) profile of the catalysts after calcination at different temperatures.

4.1.4. Textural Properties

N_2 sorption was used to investigate the textural properties of the catalysts before and after they were tested in APP of the model mixture solution. The determined specific surface areas (A_{BET}), pore volumes (V_p) and pore diameters (D_p) are shown in figure 5.

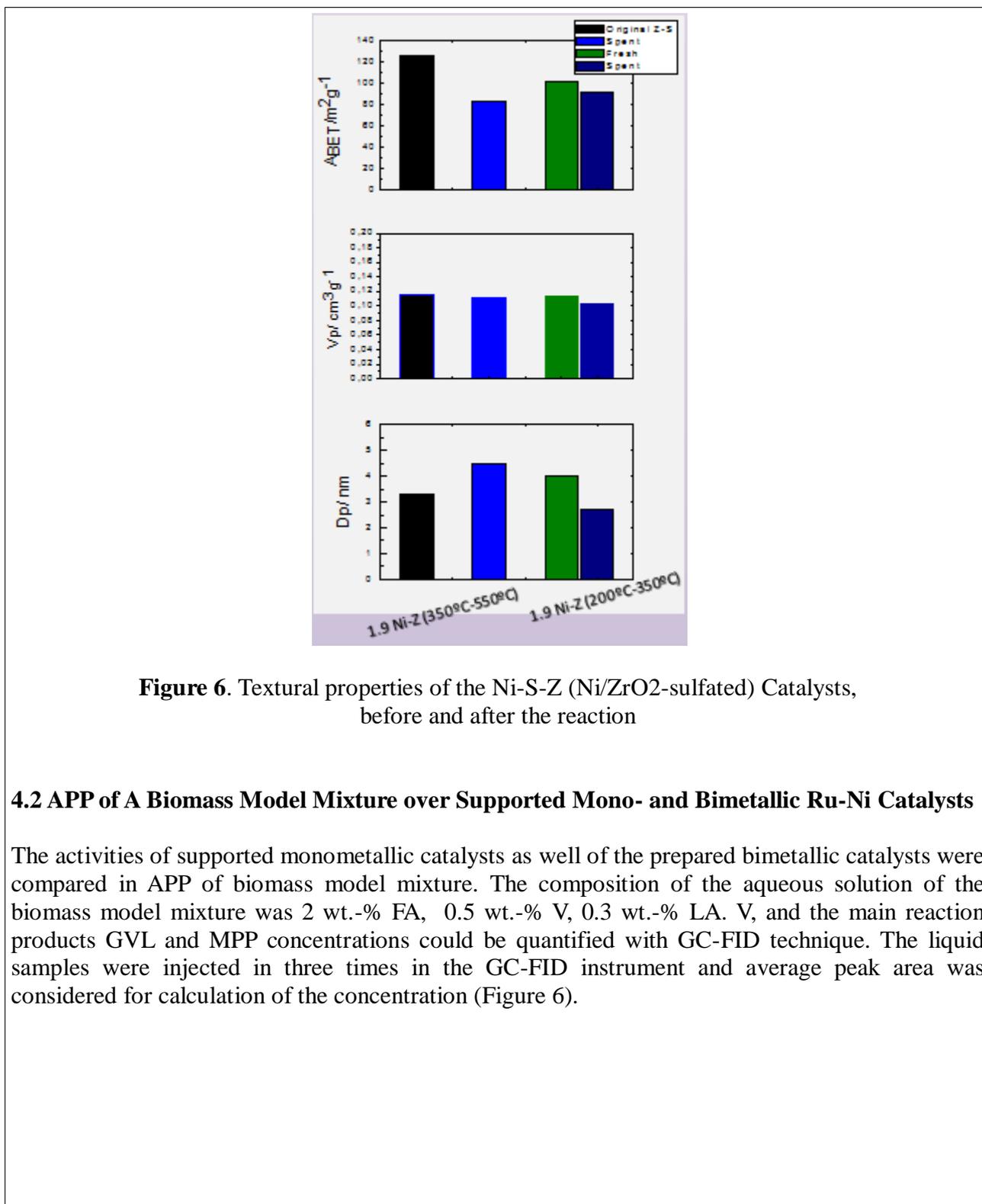


Figure 6. Textural properties of the Ni-S-Z (Ni/ZrO₂-sulfated) Catalysts, before and after the reaction

4.2 APP of A Biomass Model Mixture over Supported Mono- and Bimetallic Ru-Ni Catalysts

The activities of supported monometallic catalysts as well of the prepared bimetallic catalysts were compared in APP of biomass model mixture. The composition of the aqueous solution of the biomass model mixture was 2 wt.-% FA, 0.5 wt.-% V, 0.3 wt.-% LA, V, and the main reaction products GVL and MPP concentrations could be quantified with GC-FID technique. The liquid samples were injected in three times in the GC-FID instrument and average peak area was considered for calculation of the concentration (Figure 6).

6. ANEXOS

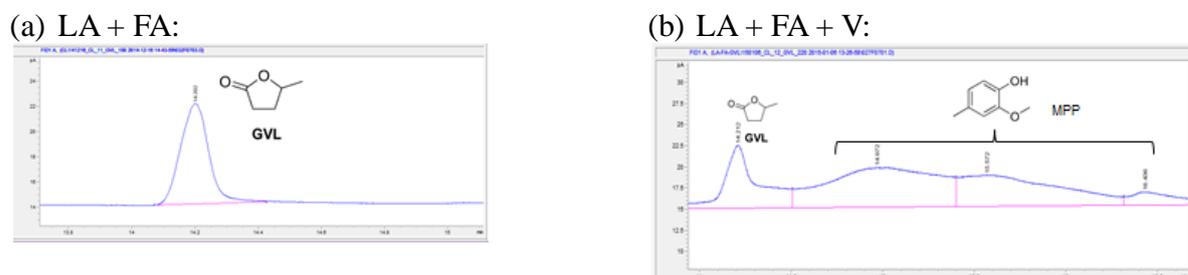


Figure 7. Chromatograms of the APP reaction products: γ -Valerolactone (GVL) and 2-Methoxy-4-methylphenol (MPP).

Two kind of reactions were tested, (a) LA + FA and (b) LA + FA + V. The main yield reaction results of (a) are collected in figure 7. For (b) a vainillin conversion of 60% and MPP selectivity of 3.80% was achieved.

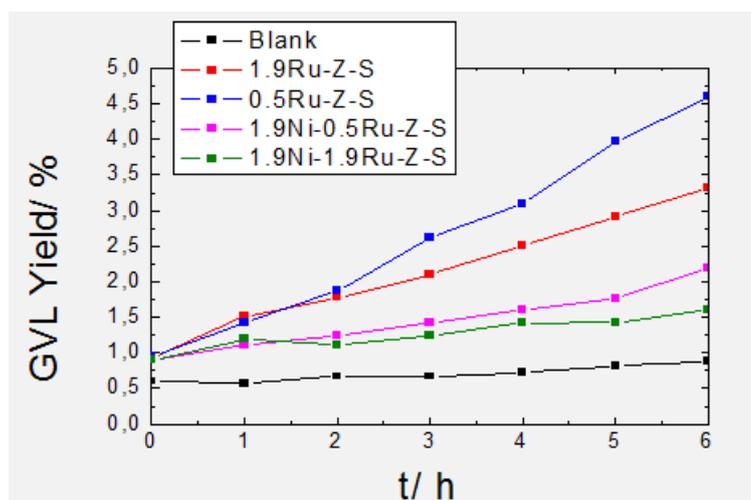


Figure 8. Evolution of the GVL yield % of the APP reaction each hour of reaction

5. CONCLUSIONS

- It is found that Ru is the most active component for GVL synthesis in the APP reaction.
- When Vanillin is used as reactant in mixture with LA is obtained other possible interesting products, such as 2-Methoxy-4-methylphenol (Creosol).
- Due to the acidic sites loss during the calcination and reduction, yield of GVL is less than 10% for ZrO₂-S supported Ru-Ni catalysts.
- Since no significant change in the textural properties occurred for the ZrO₂ based catalysts and no Ru and Ni leaching is observed during the reaction, these catalysts show great potential for APP in terms of reusability.

Acknowledgements: The subsidies granted by the Ministerio de Economía y Competitividad (Project ENE 2011-27017), Ministerio de Educacion y Ciencia (CTQ2010-18126 and CTQ2011-28954-C02-02), FEDER funds and Junta de Andalucía PO8-RMN-03515 and TEP-7723, as well as the funding for research stays to obtain the award of “International Doctorate” received from CeiA3 through the eidA3, are gratefully acknowledged.

References:

- [1] Chheda, J. N.; Huber, G. W.; Dumesic, J. A. Liquid-phase catalytic processing of biomass-derived oxygenated hydrocarbons to fuels and chemicals. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2007, 46, 7164.
- [2] Luo, W.; Deka, U.; Beale, A. M.; Van Eck, E. R. H.; Bruijninx, P. C. A.; Weckhuysen, B.M. Ruthenium-catalyzed Hydrogenation of Levulinic Acid: Influence of the Support and Solvent on Catalyst Selectivity and Stability. *J Catal*, 2013, 301, 175.
- [3] Wright, W. R. H.; Palkovits, R. Development of Heterogeneous Catalysts for the Conversion of Levulinic Acid to γ -Valerolactone. *ChemSusChem*, 2012, 5, 1657

6.2. PUBLICACIONES.

6.2.1. CAPÍTULOS DE LIBRO.

1.2) Co-autores: Luna Duran, Carlos; Sancho Puebla, Enrique; Luna Martínez, Diego; Calero Mármol, Juan; Posadillo Marín, Alejandro; Bautista Rubio, Felipa María; Romero Reyes, Antonio Ángel; Verdugo Escamilla, Cristóbal.

Título: "Production of biodiesel-like biofuel by enzymatic extracts from wild strains in vegetable oil environments".

Titulo del libro: PROCEEDINGS OF THE V INTERNATIONAL CONFERENCE ON ENVIRONMENTAL, INDUSTRIAL AND APPLIED MICROBIOLOGY (BIOMICROWORLD 2013): "INDUSTRIAL, MEDICAL AND ENVIRONMENTAL APPLICATIONS OF MICROORGANISMS. CURRENT STATUS AND TRENDS"

Editorial: Wageningen Academic Publishers
(ESPAÑA)

Lugar: MADRID

Año: 2014

Páginas: 464-469

ISBN: 978-90-8686-243-6

1.1) Co-autores: Luna Duran, Carlos; Sancho Puebla, Enrique; Luna Martínez, Diego; Calero Mármol, Juan; Posadillo Marín, Alejandro; Bautista Rubio, Felipa María; Romero Reyes, Antonio Ángel; Verdugo Escamilla, Cristóbal.

Título: "Lipase extracts from wild microbial strains to produce biofuel without glycerol".

Titulo del libro: PROCEEDINGS OF THE V INTERNATIONAL CONFERENCE ON ENVIRONMENTAL, INDUSTRIAL AND APPLIED MICROBIOLOGY (BIOMICROWORLD 2013): "INDUSTRIAL, MEDICAL AND ENVIRONMENTAL APPLICATIONS OF MICROORGANISMS. CURRENT STATUS AND TRENDS"

Editorial: Wageningen Academic Publishers

Lugar: MADRID (ESPAÑA)

Año: 2014

Páginas: 464-469

ISBN: 978-90-8686-243-6

6.2.2. ARTÍCULOS EN REVISTAS.

2.11) Co-autores: **Juan Calero, Diego Luna, Enrique D. Sancho, Carlos Luna, Felipa M. Bautista, Antonio A. Romero, Alejandro Posadillo, Julio Berbel, Cristóbal Verdugo-Escamilla.**

Título del trabajo: **AN OVERVIEW ON GLYCEROL-FREE PROCESSES FOR THE PRODUCTION OF RENEWABLE LIQUID BIOFUELS, APPLICABLE IN DIESEL ENGINES.**

Título de la revista: **Renewable and Sustainable Energy Reviews**

Volumen: **42**

Año: **2015**

DOI: [10.1016/j.rser.2014.11.007](https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.11.007)

2.10) Co-autores: **Luna Durán, Carlos; Verdugo Escamilla, Cristobal; Sancho Puebla, Enrique; Luna Martínez, Diego; Calero Mármol, Juan; Posadillo Marín, Alejandro; Bautista Rubio, Felipa M^a.; Romero Reyes, Antonio A.**

Título del trabajo: **PRODUCTION OF A BIODIESEL-LIKE BIOFUEL WITHOUT GLYCEROL GENERATION, BY USING NOVOZYM 435, AN IMMOBILIZED CANDIDA ANTARCTICA LIPASE.**

Título de la revista: **Bioresources and Bioprocessing**

Volumen **1:11**

Año: **2014**

<http://www.bioresourcesbioprocessing.com/content/1/1/11>

2.9) Co-autores: **Escobar Niño, Almudena; Luna Durán, Carlos; Luna Martínez, Diego; Marcos Rodriguez, Ana T.; Cánovas López, David; Mellado Durán, Encarnación.**

Título del trabajo: **SELECTION AND CHARACTERIZATION OF BIOFUEL-PRODUCING ENVIRONMENTAL BACTERIA ISOLATED FROM VEGETABLE OIL-RICH WASTES.**

Título de la revista: **PLoS ONE**

Volumen: **9(8): e104063**

Año: **2014**

DOI: [10.1371/journal.pone.010406320-3049](https://doi.org/10.1371/journal.pone.010406320-3049)

6. ANEXOS

2.8) Co-autores: Luna Durán, Carlos; Verdugo Escamilla, Cristobal; Sancho Puebla, Enrique; Luna Martínez, Diego; Calero Mármol, Juan; Posadillo Marín, Alejandro; Bautista Rubio, Felipa M^a.; Romero Reyes, Antonio A.

Título del trabajo: **BIOCATALYTIC BEHAVIOUR OF IMMOBILIZED *RHIZOPUS ORYZAE* LIPASE IN THE 1,3-SELECTIVE ETHANOLYSIS OF SUNFLOWER OIL TO OBTAIN A BIOFUEL SIMILAR TO BIODIESEL**

Título de la revista: **Molecules**

Volumen: **19** Año: **2014** Páginas: **11419-11439** ISSN: **1420-3049**

2.7) Co-autores: Calero Mármol, Juan; Cumplido Ruiz, Gema; Luna Martínez, Diego; Sancho Puebla, Enrique; Luna Durán, Carlos; Bautista Rubio, Felipa M^a.; Romero Reyes, Antonio A.; Posadillo Marín, Alejandro; Verdugo Escamilla, Cristobal.

Título del trabajo: **PRODUCTION OF A BIOFUEL THAT KEEPS THE GLYCEROL AS A MONOGLYCERIDE BY USING SUPPORTED KF AS HETEROGENEOUS CATALYST**

Título de la revista: **Energies**

Volumen: **7** Año: **2014** Páginas: **3764-3780** ISSN: **1996-1073**

2.6) Co-autores: Luna Durán, Carlos; Verdugo Escamilla, Cristobal; Sancho Puebla, Enrique; Luna Martínez, Diego; Calero Mármol, Juan; Posadillo Marín, Alejandro; Bautista Rubio, Felipa M^a.; Romero Reyes, Antonio A.

Título del trabajo: **A BIOFUEL SIMILAR TO BIODIESEL OBTAINED BY USING A LIPASE FROM *RHIZOPUS ORYZAE*, OPTIMIZED BY RESPONSE SURFACE METHODOLOGY.**

Título de la revista: **Energies**

Volumen: **7** Año: **2014** Páginas: **3383-3399** ISSN: **1996-1073**

6. ANEXOS

2.5) Co-autores: **Calero Mármol, Juan; Verdugo Escamilla, Cristobal; Luna Martínez, Diego; Sancho Puebla, Enrique; Luna Durán, Carlos; Bautista Rubio, Felipa M^a.; Romero Reyes, Antonio A.; Posadillo Marín, Alejandro;**

Título del trabajo: **SELECTIVE ETHANOLYSIS OF SUNFLOWER OIL WITH LIPOZYME RM IM, AN IMMOBILIZED RHIZOMUCOR MIEHEI LIPASE, TO OBTAIN A BIODIESEL-LIKE BIOFUEL, WHICH AVOIDS GLYCEROL PRODUCTION THROUGH THE MONOGLYCERIDE FORMATION.**

Título de la revista: **New Biotechnology**

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2014.02.008>

Año: **2014**

2.4) Co-autores: **Calero Mármol, Juan; Luna Martínez, Diego; Sancho Puebla, Enrique; Luna Durán, Carlos; Bautista Rubio, Felipa M^a.; Romero Reyes, Antonio A.; Posadillo Marín, Alejandro; Verdugo Escamilla; Cristobal.**

Título del trabajo: **DEVELOPMENT OF A NEW BIODIESEL THAT INTEGRATES GLYCEROL, BY USING CAO AS HETEROGENEOUS CATALYST, IN THE PARTIAL METHANOLYSIS OF SUNFLOWER OIL.**

Título de la revista: **Fuel**

Volumen: **122**

Año: **2014**

Páginas:**94-102**

ISSN: **0016-2361**

2.3) Co-autores: **Luna Martínez, Diego.; Calero Mármol, Juan; Sancho Puebla, Enrique; Luna Durán, Carlos; Posadillo MARín, Alejandro; Bautista Rubio, Felipa M^a.; Romero Reyes, Antonio A., Berbel Vecino, Julio; Verdugo Escamilla; Cristobal.**

Título del trabajo: **TECHNOLOGICAL CHALLENGES FOR THE PRODUCTION OF BIODIESEL IN ARID LANDS.**

Título de la revista: **Journal of Arid Environments**

Volumen: **102**

Año: **2014**

Páginas:**127-138**

ISSN: **0140-1963**

6. ANEXOS

2.2) Co-autores: **Luna Durán, Carlos; Sancho Puebla, Enrique; Luna Martínez, Diego; Caballero Martín, Verónica; Calero Mármol, Juan; Posadillo Marín, Alejandro; Verdugo Escamilla, Cristóbal; Bautista Rubio, Felipa M.^a; Romero Reyes, Antonio Angel.**

Título del trabajo: **BIOFUEL THAT KEEPS GLYCEROL AS MONOGLYCERIDE BY 1,3-SELECTIVE ETHANOLYSIS WITH PIG PANCREATIC LIPASE COVALENTLY IMMOBILIZED ON ALPO₄ SUPPORT.**

Título de la revista: **Energies**

Volumen: **6** Año: **2013** Páginas: **3879-3900** ISSN: **1996-1073**

2.1) Co-autores: **Luna Martínez, Diego; Posadillo Marín, Alejandro; Caballero Martín, Verónica; Verdugo Escamilla, Cristóbal; Bautista Rubio, Felipa M.^a; Romero Reyes, Antonio A.; Sancho Puebla, Enrique D; Luna Duran, Carlos; Calero Mármol, Juan.**

Título del trabajo: **NEW BIOFUEL INTEGRATING GLYCEROL INTO ITS COMPOSITION THROUGH THE USE OF COVALENT IMMOBILIZED PIG PANCREATIC LIPASE.**

Título de la revista: **International Journal of Molecular Sciences**

Volumen: **13** Año: **2012** Páginas: **10091-10112** ISSN: **1422-0067**

6.2.3. COMUNICACIONES Y PONENCIAS PRESENTADAS A CONGRESOS.

a) DE CARÁCTER INTERNACIONAL.

3.a.16) Co-autores: **Calero Mármol, Juan; Luna Martínez, Diego; Sancho Puebla, Enrique; Luna Duran, Carlos; Verdugo Escamilla, Cristóbal; Posadillo Marín, Alejandro; Bautista Rubio, Felipa María; Romero Reyes, Antonio Ángel.**

Título del trabajo: **ACHIEVEMENT OF A BIOFUEL-LIKE BIODIESEL BY REGIOSELECTIVE TRANSESTERIFICATION OF SUNFLOWER OIL WITH MUCOR MIEHEI LIPASE.**

Tipo de participación: **Póster 07.**

Congreso: **ECB16 – 16TH EUROPEAN CONGRESS ON BIOTECHNOLOGY**

Lugar de celebración: **EDIMBURGH (UK)**

Fecha: **13-16/07/2014**

3.a.15) Co-autores: **Luna Durán, Carlos; Verdugo Escamilla, Cristobal; Sancho Puebla, Enrique; Luna Martínez, Diego; Calero Mármol, Juan; Posadillo Marín, Alejandro; Bautista Rubio, Felipa M^a.; Romero Reyes, Antonio A.**

Título: **ENZYMATIC PRODUCTION OF BIODIESEL THAT AVOIDS GLYCEROL AS BYPRODUCT, BY USING IMMOBILIZED RHIZOPUS ORYZAE LIPASE.**

Tipo de participación: **Póster 04.**

Congreso: **ECB16 – 16TH EUROPEAN CONGRESS ON BIOTECHNOLOGY**

Lugar de celebración: **EDIMBURGH (UK)**

Fecha: **13-16/07/2014**

6. ANEXOS

3.a.14) Co-autores: **Luna Duran, Carlos; Sancho Puebla, Enrique; Luna Martínez, Diego; Calero Mármol, Juan; Verdugo Escamilla, Cristóbal; Posadillo Marín, Alejandro; Bautista Rubio, Felipa María; Romero Reyes, Antonio Ángel.**

Título: PRODUCTION OF A BIOFUEL SIMILAR TO CONVENTIONAL BIODIESEL THAT AVOIDS RESIDUAL GLYCEROL BY USING LIPOPAN 50BG, A LOW COST COMMERCIAL *Thermomyces lanuginosus* Lipase.

Tipo de participación: **Póster 20.**

Congreso: ***GPE – 4TH INTERNATIONAL CONGRESS ON GREEN PROCESS ENGINEERING***

Lugar de celebración: **SEVILLA (SPAIN)**

Fecha: **7-10/04/2014**

3.a.13) Co-autores: **Calero Mármol, Juan; Luna Martínez, Diego; Sancho Puebla, Enrique; Luna Duran, Carlos; Verdugo Escamilla, Cristóbal; Posadillo Marín, Alejandro; Bautista Rubio, Felipa María; Romero Reyes, Antonio Ángel.**

Título: ETHANOLYSIS OF SUNFLOWER OIL BY USING *MUCOR MIEHEI* LIPASE, TO ACHIEVE A BIOFUEL LIKE THE BIODIESEL, WHICH INTEGRATES THE GLYCEROL AS MONOGLYCERIDE

Tipo de participación: **Póster 11.**

Congreso: ***GPE – 4TH INTERNATIONAL CONGRESS ON GREEN PROCESS ENGINEERING***

Lugar de celebración: **SEVILLA (SPAIN)**

Fecha: **7-10/04/2014**

6. ANEXOS

3.a.12) Co-autores: **Calero Mármol, Juan; Cumplido Pérez, Gema; Luna Martínez, Diego; Sancho Puebla, Enrique; Luna Duran, Carlos; Posadillo Marín, Alejandro; Bautista Rubio, Felipa María; Romero Reyes, Antonio Ángel; Verdugo Escamilla, Cristóbal.**

Título: PRODUCTION OF A BIOFUEL THAT KEEPS THE GLYCEROL AS MONOGLYCERIDES BY USING SUPPORTED KF AS HETEROGENEOUS CATALYST.

Tipo de participación: **comunicación on-line c002 (DOI: [10.3390/ece-1-c002](https://doi.org/10.3390/ece-1-c002)).**

Congreso: **1ST INTERNATIONAL E-CONFERENCE ON ENERGIES**

Lugar de celebración: <http://sciforum.net/conference/ece-1>

Fecha: **14-31/03/2014**

3.a.11) Co-autores: **Luna Durán, Carlos; Calero Mármol, Juan; Verdugo Escamilla, Cristóbal; Luna Martínez, Diego; Sancho Puebla, Enrique;; Posadillo Marín, Alejandro; Bautista Rubio, Felipa María; Romero Reyes, Antonio Ángel.**

Título: BIOFUEL SIMILAR TO BIODIESEL OBTAINED BY USING A LIPASE FROM RHIZOPUS ORYZAE, OPTIMIZED BY RESPONSE SURFACE METHODOLOGY.

Tipo de participación: **comunicación on-line e008 (DOI: [10.3390/ece-1-e008](https://doi.org/10.3390/ece-1-e008)).**

Congreso: **1ST INTERNATIONAL E-CONFERENCE ON ENERGIES**

Lugar de celebración: <http://sciforum.net/conference/ece-1>

Fecha: **14-31/03/2014**

6. ANEXOS

3.a.10) Co-autores: **Calero Mármol, Juan; Verdugo Escamilla, Cristóbal; Luna Martínez, Diego; Sancho Puebla, Enrique; Luna Durán, Carlos; Posadillo Marín, Alejandro; Bautista Rubio, Felipa María; Romero Reyes, Antonio Ángel.**

Título: SELECTIVE ETHANOLYSIS OF SUNFLOWER OIL WITH LIPOZYME RM IM, AN IMMOBILIZED RHIZOMUCOR MIEHEI LIPASE TO OBTAIN A BIODIESEL-LIKE BIOFUEL THAT INTEGRATES GLYCEROL AS MONOGLYCERIDE.

Tipo de participación: **Póster 39.**

Congreso: **2nd CONGRESS ON APPLIED SYNTHETIC BIOLOGY IN EUROPE**

Lugar de celebración: **MÁLAGA (SPAIN)**

Fecha: **25-27/11/2013**

3.a.9) Co-autores: **Luna Durán, Carlos; Verdugo Escamilla, Cristóbal; Sancho Puebla, Enrique; Luna Martínez, Diego; Calero Mármol, Juan; Posadillo Marín, Alejandro; Bautista Rubio, Felipa María; Romero Reyes, Antonio Ángel.**

Título: PRODUCTION OF A BIODIESEL-LIKE BIOFUEL WITHOUT GLYCEROL GENERATION, BY USING NOVOZYME 435, AN IMMOBILIZED CANDIDA ANTARCTICA LIPASE

Tipo de participación: **Póster 38**

Congreso: **2nd CONGRESS ON APPLIED SYNTHETIC BIOLOGY IN EUROPE**

Lugar de celebración: **MÁLAGA (SPAIN)**

Fecha: **25-27/11/2013**

6. ANEXOS

3.a.8) Co-autores: **Luna Durán, Carlos; Sánchez, Leyre; Sancho Puebla, Enrique; Mellado, Encarnación; Cánovas, David; Luna Martínez, Diego; Calero Mármol, Juan; Bautista Rubio, Felipa María; Romero Reyes, Antonio Ángel; Posadillo Marín, Alejandro; Verdugo Escamilla, Cristóbal; Rodríguez Ortiz, Salvador Luis.**

Título: Lipasidic enzymatic extracts from wild microbial strains sampled and selected in animal fats environments, applied as biocatalysts to produce biofuel that integrates glycerine.

Tipo de participación: **Póster w109**

Congreso: **V INTERNATIONAL CONGRESS ON ENVIROMENTAL, INDUSTRIAL AND APPLIED MICROBIOLOGY-BIOMICROWORLD 2013.**

Lugar de celebración: **MADRID (SPAIN)**
4/10/2013

Fecha: **2-**

3.a.7) Co-autores: **Luna Durán, Carlos; Escobar-Niño, Almudena; Sancho Puebla, Enrique; Mellado, Encarnación; Cánovas, David; Luna Martínez, Diego; Calero Mármol, Juan; Bautista Rubio, Felipa María; Romero Reyes, Antonio Ángel; Posadillo Marín, Alejandro; Verdugo Escamilla, Cristóbal; Rodríguez Ortiz, Salvador Luis**

Título: OBTENTION OF LIPASIDIC ENZYMATIC EXTRACTS FROM WILD MICROBIAL STRAINS SAMPLED IN VEGETABLE OIL ENVIROMENTS, AS THEIR EVALUATION AND SELECTION AS BIOCATALYSTS IN THE ETHANOLYSIS OF TRIGLYCERIDES TO PRODUCE BIOFUEL THAT INTEGRATES GLYCERINE.

Tipo de participación: **Póster W134.**

Congreso: **V INTERNATIONAL CONGRESS ON ENVIROMENTAL, INDUSTRIAL AND APPLIED MICROBIOLOGY-BIOMICROWORLD 2013.**

Lugar de celebración: **MADRID (SPAIN)**

Fecha: **2-4/10/2013**

6. ANEXOS

3.a.6) Co-autores: Calero Mármol, Juan; Luna Martínez, Diego; Sancho Puebla, Enrique; Luna Durán, Carlos; Cumplido Ruiz, Gema; Bautista Rubio, Felipa María; Romero Reyes, Antonio Ángel; Posadillo Marín, Alejandro; Verdugo Escamilla, Cristóbal; Rodríguez Ortiz, Salvador Luis.

Título: **BIOFUEL SYNTHESIS FREE OF GLYCEROL USING CAO AS HETEROGENEOUS CATALYSTS**

Tipo de participación: **Póster p56**

Congreso: **14TH CONGRESS TRENDS IN NANOTECHNOLOGY**

Lugar de celebración: **SEVILLA (SPAIN)**

Fecha: **9-13/9/2013**

3.a.5) Co-autores: Luna Durán, Carlos; Sancho Puebla, Enrique; Luna Martínez, Diego; Calero Mármol, Juan; Cumplido Ruiz, Gema; Posadillo Marín, Alejandro; Bautista Rubio, Felipa María; Romero Reyes, Antonio Ángel; Verdugo Escamilla, Cristóbal; Rodríguez Ortiz, Salvador Luis.

Título: **SYNTHESIS OF A BIOFUEL THAT INTEGRATES GLYCEROL, BY USING HETEROGENEOUS SUPPORTED KF CATALYSTS.**

Tipo de participación: **Póster p58**

Congreso: **14TH CONGRESS TRENDS IN NANOTECHNOLOGY**

Lugar de celebración: **SEVILLA (SPAIN)**

Fecha: **9-13/9/2013**

3.a.4) Co-autores: Calero Mármol, Juan; Luna Martínez, Diego; Sancho Puebla, Enrique; Luna Durán, Carlos; Cumplido Ruiz, Gema; Bautista Rubio, Felipa María; Romero Reyes, Antonio Ángel; Posadillo Marín, Alejandro; Verdugo Escamilla, Cristóbal.

Título: **DEVELOPMENT OF A NEW BIOFUEL THAT INTEGRATES GLYCERIN BY USING CAO AS HETEROGENEOUS CATALYST.**

Tipo de participación: **Póster p92**

Congreso: **10TH CONGRESS ON CATALYSIS APPLIED TO FINE CHEMICALS**

Lugar de celebración: **TURKU/ABO (FINLAND)**

Fecha: **16-19/6/2013**

6. ANEXOS

3.a.3) Co-autores: **Luna Durán, Carlos; Sancho Puebla, Enrique; Luna Martínez, Diego; Calero Mármol, Juan; Cumplido Ruiz, Gema, Bautista Rubio, Felipa María; Romero Reyes, Antonio Ángel; Posadillo Marín, Alejandro; Verdugo Escamilla, Cristóbal.**

Título: PRODUCTION OF BIOFUELS THAT INTEGRATE GLYCEROL THROUGH THE APPLICATION OF WILD LIPASES.

Tipo de participación: **Póster p13**

Congreso: **10TH CONGRESS ON CATALYSIS APPLIED TO FINE CHEMICALS**

Lugar de celebración: **TURKU/ABO (FINLAND)**

Fecha: **16-19/6/2013**

3.a.2) Co-autores: **Calero Mármol, Juan; Luna Martínez, Diego; Sancho Puebla, Enrique; ; Luna Durán, Carlos; Cumplido Pérez, Gema, Bautista Rubio, Felipa María; Posadillo Marín, Alejandro; Romero Reyes, Antonio Ángel; Verdugo Escamilla, Cristóbal.**

Título: TECHNOLOGICAL POSSIBILITIES OF CALCIUM OXIDE AS HETEROGENEOUS CATALYST IN THE PRODUCTION OF A NEW BIOFUEL THAT INTEGRATES GLYCERIN AFTER PARTIAL TRANSESTERIFICATION OF SUNFLOWER OIL

Tipo de participación: **Póster 3.14**

Congreso: **2TH IBEROAMERICAN CONGRESS ON BIOREFINERIES**

Lugar de celebración: **JAEN (SPAIN)**

Fecha: **10–12/4/ 2013**

3.a.1) Co-autores: **Luna Durán, Carlos; Sancho Puebla, Enrique; Luna Martínez, Diego; Calero Marmol, Juan; Cumplido Pérez, Gema, Bautista Rubio, Felipa María; Posadillo Marín, Alejandro; Romero Reyes, Antonio Ángel; Verdugo Escamilla, Cristóbal.**

Título: PRODUCTION OF A NEW BIOFUEL THAT INTEGRATES GLYCERIN TROUGH SELECTIVE ETHANOLYSIS OF SUNFLOWER OIL USING LIPASES FROM WILD MICROORGANISMS

Tipo de participación: **Poster 3.13**

Congreso: **2TH IBEROAMERICAN CONGRESS ON BIOREFINERIES**

Lugar de celebración: **JAEN (SPAIN)**

Fecha: **10 – 12/4/ 2013**

b) DE CARÁCTER NACIONAL

3.b.11) Co-autores: Luna Duran, Carlos; Chen Zhihao, Nicole Wilde, Majd Al-Naji, Roger Gläser

Título: **SYNTHESIS OF γ -VALEROLACTONE FROM BIOMASS-DERIVED COMPOUNDS BY AQUEOUS-PHASE PROCESSING** using Supported Mono- and Bimetallic Catalysts.

Tipo de participación: **Poster (P10-CFQ)**

Congreso: **V ENCUENTRO SOBRE NANOCIENCIA Y NANOTECNOLOGÍA DE INVESTIGADORES ANDALUCES**

Lugar de celebración: **CORDOBA**

Fecha: **6,7/02/2015**

3.b.10) Co-autores: Luna Duran, Carlos; Verdugo Escamilla, Cristóbal; Sancho Puebla, Enrique; Luna Martínez, Diego; Calero Mármol, Juan; Posadillo Marín, Alejandro; Bautista Rubio, Felipa María; Romero Reyes, Antonio Ángel.

Título: "Influencia del procedimiento de inmovilización en el rendimiento biocatalítico de una lipasa de *Rhizopus oryzae* en la etanolisis 1,3-selectiva de triglicéridos para obtener un nuevo tipo de biodiésel.

Tipo de participación: **Póster (P23)**

Congreso: **I ENCUENTRO DE JÓVENES INVESTIGADORES DE LA SECAT: "INVESTIGACIÓN EN CATÁLISIS PARA EL FUTURO".**

Lugar de celebración: **MÁLAGA**

Fecha: **22-24/06/2014**

3.b.9) Co-autores: Calero Mármol, Juan; Luna Martínez, Diego; Luna Duran, Carlos; Sancho Puebla, Enrique; Posadillo Marín, Alejandro; Bautista Rubio, Felipa María; Romero Reyes, Antonio Ángel; Verdugo Escamilla, Cristóbal.

Título: "Síntesis de un Biocombustible que integra la glicerina como monoglicérido, usando lipasa *Mucor miehi*.

Tipo de participación: **Póster (P22)**

Congreso **I ENCUENTRO DE JÓVENES INVESTIGADORES DE LA SECAT: INVESTIGACIÓN EN CATÁLISIS PARA EL FUTURO".**

Lugar de celebración: **MÁLAGA**

Fecha: **22-24/06/2014**

6. ANEXOS

3.b.8) Co-autores: Luna Duran, Carlos; Sancho Puebla, Enrique; Luna Martínez, Diego; Calero Mármol, Juan; Cumplido Pérez, Gema; Posadillo Marín, Alejandro; Bautista Rubio, Felipa María; Romero Reyes, Antonio Ángel; Verdugo Escamilla, Cristóbal.

Título: **Producción enzimática de un nuevo tipo de biodiesel sin glicerina como subproducto mediante la aplicación de diferentes lipasas.**

Tipo de participación: **Ponencia Oral.**

Congreso: **VI JORNADAS DE DIVULGACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN EN BIOLOGÍA MOLECULAR, CELULAR, GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA**

Lugar de celebración: **UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA.**

Fecha: **8-9/05/2014**

3.b.7) Co-autores: Calero Marmol, Juan; Sancho Puebla, Enrique; Luna Martínez, Diego; Luna Duran, Carlos; Cumplido Pérez, Gema; Posadillo Marín, Alejandro; Bautista Rubio, Felipa María; Romero Reyes, Antonio Ángel; Verdugo Escamilla, Cristóbal; Rodríguez, Salvador.

Título: **OPTIMIZATION OF A LOW COST COMMERCIAL MICROBIAL LIPASE (LIOPAN 50 BG, NOVOZYMES) FOR THE PRODUCTION OF A BIOFUEL THAT INTEGRATES GLYCERINE.**

Tipo de participación: **Póster (PS8)**

Congreso: **VII CONGRESO DE LA FEDERACIÓN ESPAÑOLA DE BIOTECNÓLOGOS BIOTECH ANNUAL CONGRESS 2013**

Lugar de celebración: **SEVILLA**

Fecha: **10-12/07/2013**

3.b.6) Co-autores: Luna Duran, Carlos; Sancho Puebla, Enrique; Luna Martínez, Diego; Calero Marmol, Juan; Cumplido Pérez, Gema; Posadillo Marín, Alejandro; Bautista Rubio, Felipa María; Romero Reyes, Antonio Ángel; Verdugo Escamilla, Cristóbal; Rodríguez, Salvador.

Título: **NEW BIOFUEL OBTENTION BY APPLICATION OF SELECTED WILD MICROBIAL LIPASES**

Tipo de participación: **Póster (PS2)**

Congreso: **VII CONGRESO DE LA FEDERACIÓN ESPAÑOLA DE BIOTECNÓLOGOS BIOTECH ANNUAL CONGRESS 2013**

Lugar de celebración: **SEVILLA**

Fecha: **10-12/07/2013**

6. ANEXOS

3.b.5) Co-autores: **Luna Duran, Carlos; Sancho Puebla, Enrique; Luna Martínez, Diego; Calero Marmol, Juan; Cumplido Pérez, Gema; Bautista Rubio, Felipa María; Posadillo Marín, Alejandro; Romero Reyes, Antonio Ángel; Verdugo Escamilla, Cristóbal.**

Título: RASTREO Y AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS SILVESTRES CON LIPASAS EFICACAS PARA OBTENER BIOCOMBUSTIBLES QUE INTEGRAN LA GLICERINA.

Tipo de participación: **Póster (P 114)**

Congreso: **SECAT 13: CATALIZADORES Y REACTORES ESTRUCTURADOS**

Lugar de celebración: **SEVILLA**

Fecha: **26-28/06/2013**

3.b.4) Co-autores: **Calero Marmol, Juan; Luna Martínez, Diego; Sancho Puebla, Enrique; Luna Duran, Carlos; Cumplido Pérez, Gema; Posadillo Marín, Alejandro; Bautista Rubio, Felipa María; Romero Reyes, Antonio Ángel; Verdugo Escamilla, Cristóbal.**

Título: OPTIMIZACIÓN DE LA REACCIÓN DE TRANSESTERIFICACIÓN DE ACEITE DE GIRASOL EMPLEANDO ÓXIDO DE CALCIO COMO CATALIZADOR HETEROGÉNEO.

Tipo de participación: **Póster (P 102)**

Congreso: **SECAT 13: CATALIZADORES Y REACTORES ESTRUCTURADOS**

Lugar de celebración: **SEVILLA**

Fecha: **26-28/06/2013**

3.b.3) Co-autores: **Cumplido Pérez, Gema; Luna Martínez, Diego; Sancho Puebla, Enrique; Luna Duran, Carlos; Calero Marmol, Juan; Posadillo Marín, Alejandro; Bautista Rubio, Felipa María; Romero Reyes, Antonio Ángel; Verdugo Escamilla, Cristóbal.**

Título: OBTENCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES QUE INTEGRAN LA GLICERINA EMPLEANDO COMO CATALIZADOR HETEROGÉNEO KF SOPORTADO.

Tipo de participación: **Póster (P28-CFQ)**

Congreso: **IV ENCUESTRO SOBRE NANOCIENCIA Y NANOTECNOLOGÍA DE INVESTIGADORES ANDALUCES**

Lugar de celebración: **CORDOBA**

Fecha: **7-8/02/2013**

6. ANEXOS

3.b.2) Co-autores: **Luna Duran, Carlos; Sancho Puebla, Enrique; Luna Martínez, Diego; Calero Marmol, Juan; Cumplido Pérez, Gema; Bautista Rubio, Felipa María; Posadillo Marín, Alejandro; Romero Reyes, Antonio Ángel; Verdugo Escamilla, Cristóbal.**

Título: OBTENCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES QUE INTEGRAN LA GLICERINA MEDIANTE LA APLICACIÓN DE LIPASAS SILVESTRES.

Tipo de participación: **Oral (O18-CFQ)**

Congreso: **IV ENCUENTRO SOBRE NANOCIENCIA Y NANOTECNOLOGÍA DE INVESTIGADORES ANDALUCES**

Lugar de celebración: **CORDOBA**

Fecha: **7-8/02/2013**

3.b.1) Co-autores: **Calero Marmol, Juan; Luna Martínez, Diego; Sancho Puebla, Enrique; Luna Duran, Carlos; Cumplido Pérez, Gema; Posadillo Marín, Alejandro; Bautista Rubio, Felipa María; Romero Reyes, Antonio Ángel; Verdugo Escamilla, Cristóbal.**

Título: SÍNTESIS DE UN NUEVO BIOCOMBUSTIBLE QUE INTEGRA LA GLICERINA EMPLEANDO ÓXIDO DE CALCIO COMO CATALIZADOR HETEROGÉNEO.

Tipo de participación: **Oral (O17-CFQ)**

Congreso: **IV ENCUENTRO SOBRE NANOCIENCIA Y NANOTECNOLOGÍA DE INVESTIGADORES ANDALUCES**

Lugar de celebración: **CORDOBA**

Fecha: **7-8/02/2013**
