



PRODUCCIÓN DE BIODIESEL APARTIR DE ACEITE DE *Jatropha Curcas L*, MEDIANTE EL EMPLEO DE LIPASAS INMOBILIZADAS VIA ENCAPSULADO POR EXTRUSIÓN

Boris Guzmán Martínez (V)*, Jin An Wang, Roberto Limas Ballesteros¹

¹Escuela Superior de Ingeniería Química e Industrias Extractivas, Instituto Politécnico Nacional, Instituto Politécnico Nacional Avenida Wilfrido Massieu s/n., esq. Manuel I. Stampa, 07738, Mexico City

*Phone: +52 1-5557296000, ext: 54254, e-mail: bguzmanmartinez@gmail.com

Palabras clave: biodiesel, biocatálisis, lipasa

Introducción.

Muchos estudios se han hecho con la especie *J. curcas L* que soportan el gran potencial para la producción de biodiesel debido a su contenido de aceite (30 % a 40 %), y a la composición química de éste, que se aproxima a 21 % de ácidos grasos saturados y a 77 % de ácidos grasos insaturados, además de su alto contenido de ácidos grasos libres (>40%), al igual que se han desarrollado en su mayoría para la obtención del biodiesel con procesos de transesterificación utilizando catalizadores metálicos o en su defecto enzimas libres en un reactor por lotes, encontrando problemas de sustentabilidad económica por la regeneración de las enzimas que se emplean en el mismo para obtener un biodiesel con características físicas y químicas conforme a normas.

Las enzimas como biocatalizadores son superiores al catalizador químico debido a su alta efectividad, alta especificidad y condiciones de reacción verde. Entre las enzimas aplicadas en la biocatálisis, la lipasa se ha estudiado ampliamente debido a su característica de "activación interfacial". Las enzimas ubicuas catalizan la hidrólisis de los ésteres de ácidos carboxílicos a ácidos y alcoholes carboxílicos y las reacciones de la esterificación o transesterificación químico, regio y estereoselectiva en condiciones micro / no acuosas de manera eficiente y específica.

La lipasa de *Candida antarctica* (CAL) se atrapó por goteo por extrusión y la Jet Break Up de una mezcla acuosa de alginato de sodio (en diferentes concentraciones) y el biocatalizador a una solución de gelificación con una sal de Ca^{2+} . Se evaluaron los efectos de las condiciones de inmovilización, como la concentración de alginato, la concentración de $CaCl_2$, la relación en peso de enzima con respecto al alginato (E / A) y el tamaño de las perlas en la eficiencia de carga (porcentaje del total de enzimas atrapadas) y el rendimiento de inmovilización (relación de actividad específica de lipasa atrapada a lipasa libre).

La eficiencia de la inmovilización se expresó por las cantidades de enzima unidas sobre soportes de masa unificada, y la cantidad de enzima se determinó mediante el método de Bradford, utilizando albúmina sérica bovina como estándar de referencia.

El objetivo de este trabajo fue desarrollar la evaluación experimental de predicción de la forma y el tamaño de las microcapsulas de Ca-alginato producidas mediante el método de goteo por extrusión (250 a 320 μm) durante el proceso de inmovilización de la enzima CAL para la producción de Biodiesel a partir de aceite de *Jatropha Curcas L*. La relación entre las variables de proceso sobre la forma y el tamaño de las gotas de alginato antes y después de la gelificación se estableció con la ayuda del análisis de imágenes FIJI (Image J).

Metodología

El alginato evaluado corresponde a alginato de sodio proveniente de algas pardas de Sigma Aldrich CAS 9005-38-3. La enzima corresponde a Lipasa B de *Candida antarctica* recombinante de Aspergillus oryzae de Sigma Aldrich CAS: 9001-62-1 y la Lipasa Vegetal de *Jatropha Curcas L*. var Sevangel extraída por Salting in en el Laboratorio de Enzimología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional.

Se utilizó el siguiente montaje experimental, conforme a la Figura 1 empleando el equipo Encapsulador BUCHI B390 con diferentes toberas: 150:200, 200:350, 250:500.

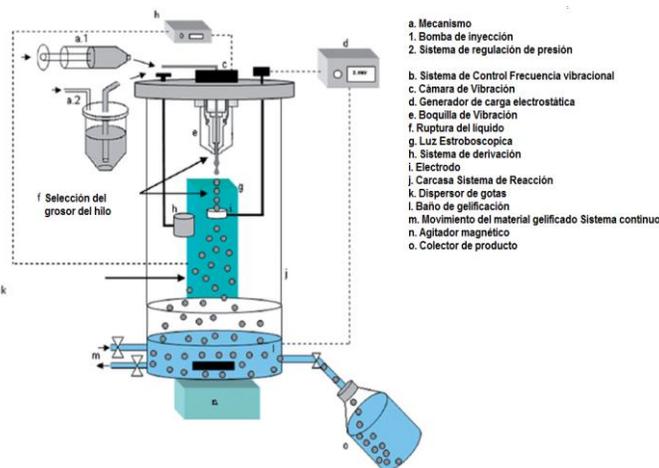


Fig-1 Montaje experimental de microencapsulado de lipasa

La microencapsulación se llevó a cabo por el método de goteo, con las siguientes variables observadas en la tabla 1.

Tabla1 Parámetros de evaluación en microencapsulado por extrusión

Parámetros Establecido	Rangos evaluados
Equipo /Nozzle	Encapsulador BUCHI B390 / 150:200
Presión mbar / Flujo	700-1000 / (1-3 m/s)
SIn $CaCl_2$	10mMol-20mMol
Tensión Electrodo	500-1000
Frecuencia de Vibración /Amplitud de paso	750 -1500 Hz / 1- 3
Distancia entre la superficie y atomizador	15- 20 cms
Presión Externa Bomba	1- 2 bar



La actividad enzimática se determinó empleando trioleína de manera preliminar para la enzima en forma libre y el aceite de *Jatropha curcas* ya como sustrato para producir el biocombustible (10 g de aceite, 2.4 g de Etanol / intervalos de 3 horas 30°C /150 rpm). La actividad enzimática de la enzima encapsulada se evaluó en un valor de pH de 7.2, y de temperatura de 35°C a una concentración 10% en peso. Se determinó la actividad de bioconversión de biodiesel por cromatografía de gases acoplado a masas.

La densidad de las soluciones de alginato se midió utilizando un medidor digital de gravedad específica (Kyoto Electronics Manufacturing Co.Ltd). La viscosidad de las soluciones se determinó usando un viscosímetro según el procedimiento estándar (Brookfield Engineering Laboratories, Inc., Modelo: LV-DV E203). La superficie la tensión de las soluciones de alginato se determinó mediante el método descrito en Lee et al. [4]

La identificación y cuantificación de los ésteres de ácidos grasos se realizó por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM). Previamente, el aceite de *Jatropha curcas* L, se derivatizó y analizó según las normas ISO 5509 (2a edición, 2000) (5).

Posteriormente un volumen de 1,0 µL se inyectó en un Cromatógrafo de gases TORION T-9 equipado con una columna de marca Elite-5, de dimensiones 5 m x 0.1mm x 0.4 µm., rango temperatura de 270 - 360°C, y se usó Helio como gas portador (99.99999% pureza). La velocidad de flujo constante del helio fue de 1.5 mL/min. El gradiente de temperatura se inició en 120°C durante 1.5 min, luego se incrementó hasta 250 °C a razón de 1.5°C/segundo durante 7 segundos. Este incremento se mantuvo hasta una temperatura de 270 °C durante 30 segundos. El volumen de inyección de la muestra fue de 1 µL, con modo de inyección tipo Split Spime con un tiempo de desorción de 10 segundos. El sistema de detección consistió en un MS/MS de iones toroidal miniaturizados (TMS) con temperatura lineal de transferencia de 300 °C, fuente de iones a 200°C, modo de ionización por impacto de iones y rango de masas 40-500 masa/carga en modo de adquisición Full Scan. Se utilizó el software integrador (Chormion) para el procesamiento de los datos.

Resultados.

Se encontró que la concentración mínima de alginato requerida para permitir la formación de la cápsula esférica fue de 15 g / L. El número de Ohnesorge (Oh) crítico que se encontró fue de 0.24 Igualmente se ha demostrado que la viscosidad de la solución de alginato de calcio debe estar por arriba de cierto rango (es decir, 60–50 mPa . s), para formar cuentas esféricas. Cuando una gota de líquido alginato golpea y entra en el baño de gelificación de sales de calcio, hay fuerzas en competencia entre la superficie viscosa (Fuerzas de tensión) y fuerzas de impacto-arrastre para mantener la forma de caída.

Se encontraron como óptimos los siguientes parámetros evaluados para la microencapsulación via extrusión. (ver Tabla 2)

Tabla 2. Propiedades físicas del alginato

Alginato concentración (g/L)	Densidad (kg/m ³)	Viscosidad (mPa . s)	Tensión Superficial (mN/m)	Oh
5	999	38	71	0.075-0.093
15	1004	130	70	0.24-0.3
25	1008	560	69	1.1-1.3
40	1017	2700	57	5.8-6.5
50	1023	4700	47	11-13

Para una solución con Oh <0.24 (es decir, concentración de alginato 0.5 g / L), Las fuerzas de tensión viscosa y superficial fueron menores que las mínimas. Estas fuerzas son necesarias para contrarrestar el efecto de impacto y arrastre. Por lo tanto, las capsulas esféricas no podrían formarse independientemente de la distancia de recolección.

En general, para la solución de alginato con Oh> 0.24, la transición de la forma de las capsulas de Ca-alginato aumenta la distancia de recolección Podrían distinguirse en tres fases que siguen la tendencia de en forma de lágrima (fase I) esférica (fase II) en forma de huevo (fase III).

Por otro lado, para Oh <0.24, la cápsula tenía forma de lágrima o pera a corta distancia de recolección y forma de pera a larga distancia de recolección.

Bajo estos parámetros se obtuvieron cápsulas de tamaños y formas esféricas que oscilan entre los 210 y los 320 µm conforme a lo observado en la Figura 2 y 3 respectivamente.

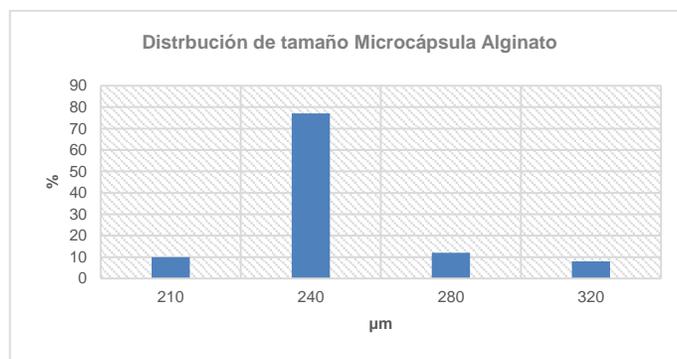


Figura 2. Distribución de tamaño de cápsula



Figura -3 Observación en microscopía óptica de las cápsulas de alginato

La actividad enzimática muestra bioconversiones mayores al 80% hasta por 8 ciclos conforme a lo observado en la

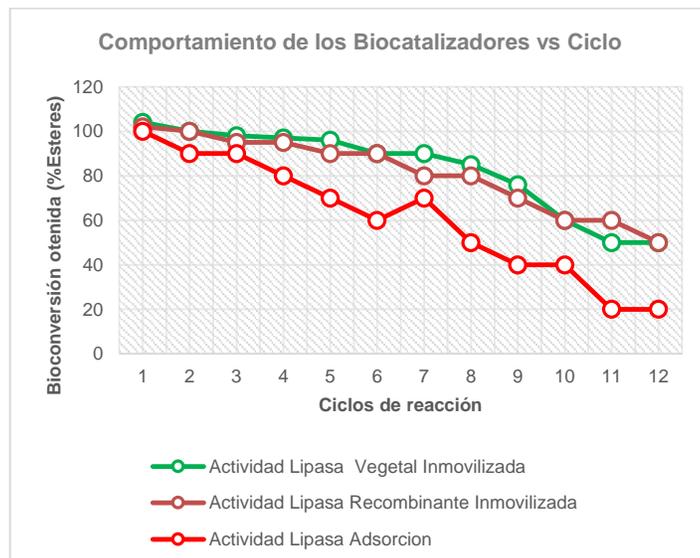


Figura 4 Estabilidad Operacional de las lipasas inmovilizadas en microcápsulas de alginato

Conclusiones.

-Pese a que se evidencia fenómenos de atrición sobre la liberación de las enzimas inmovilizadas microencapsuladas (CAL Recombinante) luego del segundo ciclo ($>10 \mu\text{g/mL}$), se logran bioconversiones mayores a 90% después de 8 ciclos.

-El tamaño de partícula de los microencapsulados oscila entre los 240-280 μm de forma Esférica, y de los inmovilizados en resina entre 270 y 350 μm .

-Se encontró que la concentración mínima de alginato requerida para permitir la formación de cápsulas esféricas era de 15 g / L. El número crítico de Ohnesorge (Oh) se encontró que era 0.24. Trabajos anteriores han demostrado que la viscosidad de la solución de alginato debe estar por encima de cierto rango (es decir, 60 a 50 mPa s), para formar cápsulas esféricas.

-Los resultados muestran que se necesitaba un número crítico de Ohnesorge (Oh) > 0.24 para formar cápsulas esféricas.

La transición de la forma de las perlas de alginato de Ca se podría distinguir típicamente en tres fases a lo largo de la distancia de recolección y se vio afectada por la influencia combinada de las propiedades de la solución, la distancia de recolección y el tamaño de la gota. El enfoque y los resultados podrían utilizarse como modelo para desarrollar herramientas de predicción para sistemas similares de producción de microencapsulados. La cantidad óptima de lipasa fue de 10% p/p, el pH y la temperatura óptima para la condición de transesterificación de la CAL inmovilizada fue de 7.2 a 35 ° C, respectivamente. Además, la CAL inmovilizada mantuvo la alta actividad en un 80% después de 8 veces de reciclaje para la hidrólisis discontinua de la emulsión de aceite de Jatropha

Muchos informes han llegado a la conclusión de que la proporción M / G de alginato tiene una gran influencia en el grado de contracción, ya que afecta al mecanismo de gelificación (es decir, la formación de la "caja de huevos"). El alginato de menor relación M / G forma un gel más rígido y poroso si se compara con el de la mayor relación M / G.

Otras posibles causas de la variación podrían ser la fuente de alginato, el tipo y la concentración del agente de reticulación, la presencia de agente quelante o impureza, así como las condiciones de gelificación.

Agradecimientos.

Los autores manifiestan su agradecimiento al Instituto Politécnico Nacional y al **CONACYT-OEA-AMEXCID** por el apoyo a mis estudios al otorgarme la beca No. 290786.

Bibliografía.

- Chan, E.-S., Lee, B.-B., Pogaku, R., (2009). Prediction models for shape and size of Ca-alginate macrobeads produced through extrusion-dripping method. *Journal of Colloids and Interface Science*, 338, 63–72.
- A.R.M. Yahya, W.A. Anderson, M. Moo-Young. (1998). Ester synthesis in lipase-catalyzed reactions, *Enzyme Microbiology Technology* 23, (1998), 438–450.
- K. Won, S. Kim, K.-J. Kim, H.W. Park, S.-J. Moon (2005), Optimization of lipase entrapment in Ca-alginate gel beads, *Process Biochemistry*, 40, 2149–2154.
- B.B. Lee, P. Ravindra, E.S. Chan, (2009), *Colloids Surf. A: Physicochemistry. Engineering Aspects* 112
- Animal and vegetable fats and oils-Preparation of methyl esters of fatty acids e ISO 5508 (2a edición, 1990) Animal and vegetable fats and oils-Analysis by gas chromatography of methyl esters of fatty acids